

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 10 月 4 日 (04.10.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/73102 A1

(51) 国際特許分類: C12P 17/06, A23L 1/30 //
C12N 9/24, (C12P 17/06, C12R 1:80)

小池田聡 (KOIKEDA, Satoshi) [JP/JP]; 〒509-0108 岐阜県各務原市須衛町四丁目179番35 天野エンザイム株式会社 岐阜研究所内 Gifu (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/02656

(22) 国際出願日: 2001 年 3 月 29 日 (29.03.2001)

(74) 代理人: 弁理士 小栗昌平, 外(OGURI, Shohei et al.)
; 〒107-6028 東京都港区赤坂一丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-092133 2000 年 3 月 29 日 (29.03.2000) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 鶴喰寿孝 (TSURUHAMI, Kazutaka) [JP/JP]. 東本篤樹 (TOUMOTO, Atsuki) [JP/JP]. 後藤真孝 (GOTO, Masataka) [JP/JP].

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING AGLYCON BY USING DIGLYCOSIDASE AND FLAVOR-IMPROVED FOOD CONTAINING THE AGLYCON AND CONVERTING AGENT TO BE USED IN THE PROCESS

(54) 発明の名称: ジグリコシダーゼによるアグリコン及び該アグリコン含有風味改善食品の製造法並びに該製造法に用いる変換剤

(57) Abstract: A physiologically active substance of the aglycon type (in particular, aglycon isoflavone) can be efficiently produced, without resort to any acid/alkali treatment or fermentation and substantially without changing the physical properties of a material, by treating the material with a sufficient amount of diglycosidase for a sufficient period of time at an appropriate temperature and pH value so that a physiologically active substance of the glycoside type contained in the material can be converted into the physiologically active substance of the aglycon type. By using diglycosidase and/or a specific enzyme preparation, the aglycon content in a protein or a protein-containing food can be elevated and the flavor thereof can be improved.

(57) 要約:

充分な量のジグリコシダーゼを、原料中の配糖体型の生理活性物質がアグリコン型の生理活性物質へ変換されるのに充分な時間、温度及び pH で反応させることによって酸・アルカリ処理や醗酵工程によらず、素材の物理的性質を実質的に変えることなく、且つ効率よくアグリコン型の生理活性物質、特にアグリコンイソフラボンを製造することができ、またジグリコシダーゼ及び／又は特定の酵素剤を使用することにより蛋白質又は蛋白質含有食品のアグリコン量を高め、またその風味を改善することもできる。



WO 01/73102 A1



添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明細書

シグリコシダーゼによるアグリコン及び該アグリコン含有風味改善食品の製造法並びに該製造法に用いる変換剤

技術分野

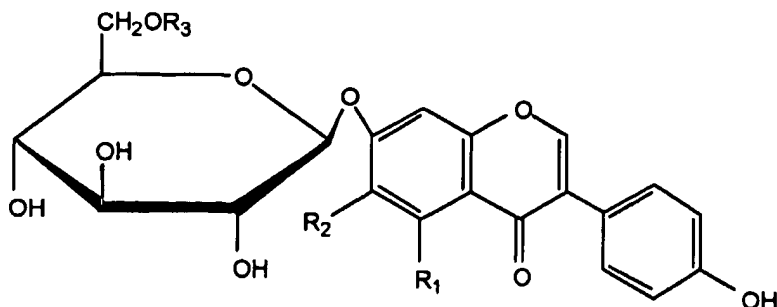
本発明は、アグリコンの製造方法、アグリコン含量を高めた蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法、風味が改善された蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法及び生体内でイソフラボンを生成させる方法に関する。本発明は、加工食品、健康食品、栄養補助食品、医薬品の製造等に利用できる。

背景技術

配糖体はアグリコンと呼ばれる非糖質部分に糖が結合した化学物質であり、自然界に広く存在している。

配糖体には、抗酸化作用等を有するポリフェノール、弱いエストロゲン作用を有するファイトエストロゲン等のファイトケミカル（植物性の機能成分）のように、配糖体それ自身では腸管吸収が悪く生理活性を示さないが、腸内細菌が産生するグルコシダーゼ等のグリコシダーゼにより分解されて生ずるアグリコンにより生理活性が示されるものがあることが知られており、ガン、動脈硬化、骨粗鬆症、更年期障害等の生活習慣病、高齢化に伴う疾患の予防や症状の軽減に効果がある点から、大豆蛋白濃縮物、大豆加工素材及び該大豆蛋白濃縮物等を含有する食品に関心が集まっている。

このファイトケミカルの中で、下記の一般式で示すイソフラボンをアグリコンとするグルコシド（以下、イソフラボングルコシドともいう）には、ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン等のアグリコンが含まれ、乳ガンや前立腺ガン細胞の増殖を抑制、動脈硬化、骨粗鬆症などの軽減、女性ホルモンのエストロゲン様の作用を示すことによる更年期障害を軽減することが、細胞レベル・疫学的な調査などで明らかになっている。



(ここで、 R_1 及び R_2 は、それぞれH、OH及び OCH_3 から成る群から独立に選ばれ、 R_3 は、H、 $COCH_3$ 、 $COCH_2COOH$ 及び $COCH_2CH_2COOH$ から成る群から独立に選ばれる。)

しかし、高齢者、病人、抗生物質の投与を受けているような患者等では腸内細菌により十分な量のグリコシダーゼが産生されない可能性があると共にグリコシダーゼではアセチル、マロニル基等により修飾された配糖体や二糖、三糖配糖体の分解が困難であること等から、大豆蛋白の濃縮物等に含まれるファイトケミカルの十分な吸収が望めない。

また、大豆蛋白の濃縮物等の大豆加工素材は、その独特の臭いと苦味の為、特に欧米においては該大豆加工素材等を含有する食品の摂取が敬遠され、アグリコンイソフラボンの供給源として限界があった。

従って、ファイトケミカルを生体内で効率良く生成する方法及びより吸収効率が高くより少量で十分量のイソフラボンを摂取することができるアグリコンイソフラボンに富み且つより大豆独特の臭いと苦味の少ない大豆加工素材又は該大豆加工素材を含有する食品等の風味の改善が望まれている。

一方、イソフラボングルコシドをアグリコンイソフラボンへ変換する方法については、公開公報(特開平10-117792)に記載されているように公知である。この方法は、植物性蛋白質抽出物をアルカリ処理して修飾グルコシドイソフラボンをグルコシドイソフラボンへ変換させ、グリコシダーゼ処理を行っている。既存のグリコシダーゼは、修飾グルコシドイソフラボンに直接作用できないゆえの処理である。このように、2段階の工程を要すること、更にアルカリ処理による苦みの増強、物性や成分の変化、副産物の生成、アルカリ処理後の廃液の問題などを伴う。また、作用の

主要を成すグルコシダーゼは、遊離グルコースの影響を受け易いので製造に用いる素材の種類や濃度が制限されることが考えられる。

また、公開公報（特開平 8-214787）には、微生物を用いた発酵によりグルコシドイソフラボンからアグリコンイソフラボンへの転換方法が記載されている。しかし、生成したアグリコンイソフラボンが微生物によって分解を受ける、予想外の副産物が生成するなどの可能性があり、実際の製造に用いるには多くの点で問題があると考えられる。

さらに、塩酸の様な酸による酸加水分解による方法も考えられるが、条件が過激であるがゆえに蛋白質、リン脂質、中性脂質およびその他成分の分解そして副産物の生成がおこる。特に、その発癌性が報告されている塩素化合物 MCP（モノクロロプロパノール）、DCP（ジクロロプロパノール）の生成は避けられない。

それ故、本発明の目的は、酸・アルカリ処理や醗酵工程なしに、素材の物理的性質を実質的に変えることなく、且つ効率よくアグリコン型の植物性生理活性物質を製造する方法を提供することである。また、本発明はジグリコシダーゼ及び／又は特定の酵素剤を使用することにより蛋白質又は蛋白質含有食品のアグリコン量を高め、またその風味を改善することを目的とする。この目的及びその他の目的は、以下に示す詳細な説明でさらに明らかとなる。

発明の開示

我々は、種々の微生物を起源に発見されたジグリコシダーゼが既存のグリコシダーゼで分解が困難であった配糖体を効率的に分解し、また、体内においても作用することを鋭意研究の末発見し、本発明を完成した。さらに、ジグリコシダーゼであれば給源にかかわることはなく、本発明を実施できることを見出した。

すなわち、本発明は、以下の通りである。

(1) ジグリコシダーゼを、ファイトエストロゲン、ポリフェノール、イソフラボン、ビオカニン A、ホルムオノネチン、クメストロール及びリグナンからなる群から選択される化合物をアグリコンとする配糖体へ作用させてアグリコンを生成させることを特徴とするアグリコンの製造方法。

(2) アグリコンがイソフラボンである請求項1のアグリコンの製造方法。

(3) イソフラボンをアグリコンとする配糖体がダイズイン、ゲニスチン又はグリシチン、これらのアセチル体、サクシニル体又はマロニル体からなる群から選択される1種以上である上記アグリコンの製造方法。

(4) ジグリコシダーゼがグルコース耐性を有するものである上記アグリコンの製造方法。

(5) ジグリコシダーゼがペニシリウム マルタイカラー (*Penicillium multicolor*) IAM7153が産生するジグリコシダーゼである上記のアグリコンの製造方法。

(6) 蛋白質又は蛋白質含有食品にジグリコシダーゼを作用させる工程を含むことを特徴とするアグリコン含量を高めた蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法。

(7) 蛋白質又は蛋白質含有食品がイソフラボンをアグリコンとする配糖体を含有する上記アグリコン含量を高めた蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法。

(8) 製造される蛋白質又は蛋白質含有食品が更に風味が改善されたものである上記アグリコン含量を高めた蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法。

(9) イソフラボンをアグリコンとする配糖体がダイズイン、ゲニスチン又はグリシチン、これらのアセチル体、サクシニル体又はマロニル体からなる群から選択される1種以上である上記アグリコン含量を高めた蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法。

(10) 更にアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、 α -グルコシダーゼ及び酵母溶解性酵素からなる群より選ばれた少なくとも1種の酵素を主体として含む酵素剤を作用させる工程を含むことを特徴とする上記アグリコン含量を高めた蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法。

(11) 風味の改善が、苦味及び/又は収斂味の低減である上記アグリコン含量を高めた蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法。

(12) 蛋白質又は蛋白質含有食品に、アミラーゼ、セルラーゼ、ヘクチナーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、 α -グルコシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ及

び酵母溶解性酵素からなる群より選ばれた少なくとも1種の酵素を主体として含む酵素剤を作用させる工程を含むことを特徴とする風味が改善された蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法。

(13) 蛋白質又は蛋白質含有食品がフラボノイドをアグリコンとする配糖体を含有する上記風味が改善された蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法。

(14) 蛋白質又は蛋白質含有食品がイソフラボンをアグリコンとする配糖体を含有する上記風味が改善された蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法。

(15) ジグリコシダーゼを経口投与し、生体内で配糖体からアグリコンを生成させる方法。

(16) ジグリコシダーゼを経口投与し、生体内でイソフラボンをアグリコンとする配糖体からイソフラボンを生成させる上記方法。

さらに本発明は以下を提供可能である。

(17) ジグリコシダーゼを配糖体型の生理活性物質へ作用せしめることを特徴とする、配糖体型の生理活性物質をアグリコン型の生理活性物質へ変換する方法。

(18) 配糖体型の植物性生理活性物質を含有する植物材料にジグリコシダーゼを作用せしめることを特徴とする、アグリコン型の植物性生理活性物質に富んだ組成物の製造方法。

(19) 配糖体型の生理活性物質を含有する食物の摂取前、摂取中、及び／又は摂取後に、ジグリコシダーゼを経口投与することを特徴とする生理活性物質の生体吸収の促進方法。

(20) 少なくともジグリコシダーゼを含有することを特徴とする、配糖体型の生理活性物質のアグリコン型の生理活性物質への変換剤。

本発明のこれらの態様及びその他の態様は、以下に示す詳細な説明でさらに明らかとなる。

本発明に記載したジグリコシダーゼは、ファイトエストロゲン、ポリフェノール、イソフラボン、ビオカニンA、ホルムオノネチン、クメストロール及びリグナンからなる群から選択される化合物をアグリコンとする配糖体（以下、アグリコン配糖体ともいう）に対して効率よく作用するが、特にイソフラボンをアグリコンとする配糖体

(以下、イソフラボン配糖体ともいう) に対して非常に効率よく作用でき、かつ遊離グルコースの影響をほとんど受けないものである。従って、イソフラボン配糖体がダイズイン、ゲニスチン又はグリシチン、これらのアセチル体、サクシニル体又はマロニル体等の場合に有利に行える。尚、イソフラボン配糖体から生成されるイソフラボンをアグリコンイソフラボンともいう。

また、このジグリコシダーゼを投与することで経口摂取されたアグリコン配糖体乃至それを含む食品からイソフラボンを生成させることにより各種疾病への予防効果を高める事ができる。ジグリコシダーゼはペニシリウム マルタイカラー (Penicillium multicolor) IAM7153が産生するものを用いることが好ましい。ペニシリウム マルタイカラー由来の β -ガラクトシダーゼは食品添加物リストに掲載されている安全性の認められている酵素であり、かかる安全性の高い菌から生産されるジグリコシダーゼについても高い安全性が推定される。

また、大豆を原料にした場合、大豆蛋白濃縮物や大豆加工素材の健康上の利点が報告されているものの、その独特の臭いと苦味の為、特に欧米においては摂取が敬遠されている。前述したアセチルグルコシドイソフラボンやマロニルグルコシドイソフラボンは苦味が強く、アグリコンイソフラボンは苦味が少ない。したがってジグリコシダーゼによるアグリコンイソフラボンへの変換により、大豆蛋白濃縮物や大豆加工素材の苦味を効率良く低減した食品を提供することも可能である。

この様なイソフラボンがより吸収効率の高いアグリコンとして濃縮されたより苦味の少ない大豆蛋白濃縮物や大豆加工素材を用いれば、より少量で十分量のイソフラボンを摂取することができ、大豆独特の臭いと異味を敬遠する人々にとっても摂取しやすい形態に変えることができる。

また、大豆蛋白濃縮物や大豆加工素材の臭い・異味のため、食品原料として用いる場合にはその使用量が制限され、それ故、食品へのイソフラボンの供給源としては大豆蛋白濃縮物や大豆加工素材には限界があった。本発明により、イソフラボン配糖体をジグリコシダーゼで消化し、より吸収効率の高いアグリコンであるイソフラボンとして濃縮されたより苦味の少ない大豆蛋白濃縮物や大豆加工素材を用いれば、より少量の使用で食品へのイソフラボンの供給が可能となり、イソフラボン供給源としてよ

り多くの種類の食品に利用可能である。

本発明で使用されるジグリコシダーゼは、既存のグルコシダーゼが基質として利用しがたい二糖配糖体に作用して該二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離すると共にアグリコンを生成させる活性を有することで特徴付けられる。本明細書においては、上記の活性を有する酵素を「ジグリコシダーゼ」と呼ぶ。

本発明におけるジグリコシダーゼとは、糖鎖加水分解酵素に分類されるが既存の各種 α -及び β -グリコシダーゼとは異なった性質を持つ酵素である。このジグリコシダーゼは、単一あるいは複数の種類の糖類より構成された直鎖および分岐糖鎖と糖類以外の化合物が糖鎖の水酸基を介して結合したいわゆる配糖体を基質とする事ができ、二糖単位で基質を認識して切断し、相当する二糖そして二糖分少なくなった糖鎖を有するアグリコンを逐次生成し、最終的にアグリコンを生成する。また、既存のグルコシダーゼでは難分解であるアセチル体、サクシニル体又はマロニル体等の修飾グルコシドを糖とアグリコンに分解する。自然界に存在する糖鎖の代表例として、デンプン、セルロース、細胞壁を構成する多糖類などが挙げられる。二糖配糖体の糖鎖は多種考えられるが、例えば自然界には、6-O- β -D-キシロピラノシル- β -D-グルコピラノシド (β -プリメベロシド)、6-O- α -L-アラビノピラノシル- β -D-グルコピラノシド (ピシアノシド)、6-O- α -L-アラビノフラノシル- β -D-グルコピラノシド、6-O- α -L-ラムノピラノシル- β -D-グルコピラノシド (ルチノシド)、6-O- β -D-アピオフラノシル- β -D-グルコピラノシド、6-O- β -D-グルコピラノシル- β -D-グルコピラノシド (ゲンチオビシド)、4-O- α -グルコピラノシル- β -D-グルコピラノシド (マルトース)、2-O- α -L-ラムノピラノシル- β -D-ガラクトピラノシド (ラムニース)、6-O- α -L-ラムノピラノシル- β -D-ガラクトピラノシド (ロビノビシド)、2-O- β -D-キシロピラノシル- β -D-グルコピラノシド (キシロシルグルコース)、4-O- β -D-グルコピラノシル- β -D-グルコピラノシド (セロビオシド)、キシロビオシドなどがある。ここに挙げたもの以外に、二糖構造であればどのような糖の組み合わせでも反応の基質として認識する事が可能である。アグリコンとは、配糖体を構成している糖以外の化合物のことを示すものであ

る。自然界において、配糖体のアグリコンは広く存在し、その代表例として、植物の揮発性化合物としてのリナロール、ゲラニオール、シトロネール、フェネチルアルコール、シトロネロール、ジャスミン類、リモネン、テルピネン、シトラール、ネロール、ピネン、ボルネオール、テルピネオール、メチルジャスモネート、ヘキサノール、ヘキセノール、ヘキサナール、ヘキセナール、バニリン、ベンズアルデヒド、オイゲノール、サリチル酸メチル、リナロールオキシド、ベンジルアルコール、ボミフォミトールなどで、植物の色素化合物であるアリザリン、プルプリン、アントシアニンとしてペラゴニン、シアニン、デルフィニン、ペオニン、ペチュニン、マルビディンそしてフラボノイド類としてナリルチン、ナリングニン、ヘスペレチン、ネオヘスペレチン、ジオスメチン、ケルセチン、カンフェロール、ミリセチン、イソラムネチン、シリングニンなどがある。ここに挙げたもの以外でも、様々な化合物が配糖体のアグリコンとして存在し、あるいは配糖体のアグリコンとなる事ができる。

更に、ジグリコシダーゼは上に記載した二糖遊離活性の他に、一分子の糖とアグリコンが結合したいわゆる単糖配糖体も基質とすることができ、相当する単糖とアグリコンを生成する事ができる。特に、既存の β -グルコシダーゼで難分解性の単糖配糖体にも作用することができる点が特徴としてあげられる。

本発明で用いるジグリコシダーゼは、当業者に過度の実験を要求することなく、該ジグリコシダーゼ生産能を有する微生物から得ることができる（例えば、WO 00/18931参照）。

本発明のジグリコシダーゼを生産する微生物は、例えば以下のようにしてスクリーニングすることで得ることができる。即ち、土壌の懸濁液を、オイゲニルプリメベロシド等を唯一の炭素源として含有する分離用液体培地に接種することにより集積培養を行い、その培養液を同様の分離用平板寒天培地に塗布して、生育したコロニーを選択して拾う。これらの菌株を適当な液体培地で培養して、pNP-プリメベロシド等から二糖を切り出し、pNP遊離活性を有する菌株を選択することができる。

このようにして選択された菌株について、更にpNP-プリメベロシド等を基質として二糖遊離を指標としてジグリコシダーゼ産生微生物をスクリーニングすることができる。

すでに、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*) IFO 4407 (入手先 財団法人 発酵研究所 大阪市淀川区十三本町2-17-85)、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*) IAM 2020、アスペルギルス フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) IAM2046、ペニシリウム マルタイカラー (*Penicillium multicolor*) IAM7153 (入手先 東京大学部分子細胞生物学研究所 東京都文京区弥生1-1-1) 等にその生産能が確認されている。

また、その他の様々な微生物においても、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、リゾプス (*Rhizopus*) 属、リゾムコール (*Rhizomucor*) 属、タラロマイセス (*Talaromyces*) 属、モルチエレラ (*Mortierella*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、アクチノプラネス (*Actinoplanes*) 属等の様々な微生物にジグリコシダーゼ活性を確認されている。

本発明において利用できる菌種は、ジグリコシダーゼ産生能を有する菌種であれば何れも使用することができ、上述した菌種に限定されない。更に、本発明において利用できるジグリコシダーゼの生産方法としては、ジグリコシダーゼ産生能を有する菌種の突然変異株、あるいは組換えDNA法によりジグリコシダーゼを生産できるように改変された各種微生物、或いは各種細胞 (例えば、酵母細胞、細菌細胞、高等植物細胞、動物細胞等) をも包含し、特に、ジグリコシダーゼを高生産できるように改変されたものが好ましい。ジグリコシダーゼ遺伝子を導入することで、ジグリコシダーゼ産生能を付与する場合にはホストとなる微生物にはジグリコシダーゼ産生能がなくてもよい。

上述した各種微生物などを用いてジグリコシダーゼを製造するためには、当該微生物の培養に適合した方法や条件を設定でき、これらの方法や条件は特に限定されない。例えば、上述した各種菌種の培養法としては液体培養、固体培養の何れでも良いが、好ましくは液体培養が利用される。液体培養としては例えば、以下のようにして行う

ことができる。

使用できる培地としては、ジグリコシダーゼを生産する微生物が生育可能な培地であれば、如何なるものでも良い。例えば、グルコース、シュクロース、ゲンチビオース、可溶性デンプン、グリセリン、デキストリン、糖蜜、有機酸等の炭素源、更に硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、或いは、ペプトン、酵母エキス、コーンステイープリカー、カゼイン加水分解物、ふすま、肉エキス等の窒素源、更にカリウム塩、マグネシウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、鉄塩、亜鉛塩等の無機塩を添加したものをを用いることができる。更に、ジグリコシダーゼを生産蓄積せしめるために培地に各種の誘導物質を添加することができる。誘導物質としては例えば糖類が使用でき、好ましくはゲントース(例えば、ゲントース#80、日本食品化工(株))、ゲンチビオース、ゲンチオリゴ糖(例えば、ゲンチオリゴ等、和光純薬工業(株))、ガラクトマンナン等が利用できる。これらの誘導物質の添加量は目的とするジグリコシダーゼの生産能が増大される量であれば特に限定されないが、好ましくは0.01~10%が添加される。

培地のpHは例えば約3~8、好ましくは約5~6程度に調製し、培養温度は通常約10~50℃、好ましくは約25~30℃程度で、1~15日間、好ましくは4~7日間程度好氣的条件下で培養する。培養法としては例えば振盪培養法、ジャーファーマンターによる好氣的深部培養法が利用できる。しかしながら、上述した各種の培養条件などは当然のことながら、培養する対象である微生物や細胞により適宜変更され、本発明のジグリコシダーゼが生産される条件であれば、その条件等は限定されない。

得られた培養液からジグリコシダーゼを単離精製するには、ジグリコシダーゼ活性を指標として、遠心分離、UF濃縮、塩析、イオン交換樹脂等の各種クロマトグラフィーを組み合わせ、常法により処理して、精製したジグリコシダーゼを得ることができる(参考文献 蛋白質・酵素の基礎実験法、堀尾 武一著、南江堂)。

本発明の酵素組成物は上述の微生物を培養した培養液そのままでも利用できる。もちろん本培養液は本発明の使用目的に応じてその精製度合いを適宜変更することができる。

本発明は、ジグリコシダーゼによるファイトエストロゲン、ポリフェノール、イソフラボン、ヒオカニンA、ホルムオノネチン、クメストロール及びリグナンからなる群から選択される化合物をアグリコンとする配糖体へ作用させてアグリコンを生成させるアグリコンの製造方法を提供する。この製造方法は、上記化合物をアグリコンとする配糖体を含む植物材料を好ましくは弱酸性条件下で十分な量のジグリコシダーゼ酵素と、原料中の少なくとも大部分の配糖体がアグリコンを生成するのに十分な時間、温度およびpHで反応させ、それによってアグリコンを製造する事を含む。本発明は、ジグリコシダーゼがアグリコンに富んだ植物抽出物を製造する為に、植物抽出物中に添加されるような製造方法を提供する。

この新規な方法は、二糖配糖体加水分解酵素、ジグリコシダーゼを含む酵素製剤によるアグリコン配糖体の大部分を遊離のアグリコンに転換する1工程の方法である。アグリコン配糖体は植物材料中、好ましくは蛋白質又は蛋白質食品に存在するものに有効である。この方法は、修飾グルコシドイソフラボンおよびグルコシドイソフラボンのアグリコンイソフラボンへの実質的に完全な転換を可能にすることが見出されているので、修飾グルコシドイソフラボンおよびグルコシドイソフラボンのアグリコンイソフラボンへの転換を含む。ある植物性蛋白質材料、特に大豆蛋白質材料においては、植物性蛋白質材料中の全イソフラボン内容物の実質的な部分がイソフラボン配糖体の形態で存在する。それゆえ、グルコシドイソフラボンをアグリコンイソフラボンへ転換するだけでなく、修飾グルコシドイソフラボンをアグリコンイソフラボンへ転換することは、植物性蛋白質材料から得ることができるアグリコンイソフラボンの量を最大限に増加させるために必要である。

好ましい態様の方法における出発材料は、配糖体型の生理活性物質を含むあらゆる蛋白質又は蛋白質含有食品（さらに好ましくは植物材料、植物性蛋白質、植物性蛋白質含有食品）である。以下の説明中のある方法は、大豆の生成物を例として記載されるが、本発明の方法は大豆や大豆の生成物以外の蛋白質又は蛋白質含有食品の広範囲に一般的に適用することができる。

本発明で「蛋白質又は蛋白質含有食品」とは、配糖体型の生理活性物質を含むことが好ましいが特に限定されない。

本発明で「植物材料」とは、可食性あるいは薬用に用いられる植物体の全体あるいは葉、花、実、茎、根などの一部分とそれらの加工物を意味し、その例としては採取された植物体の全体あるいは葉、花、実、茎、根などの一部分や、植物抽出物、それらの加工物があげられる。植物材料の具体例としては以下のような材料が含まれる。大豆タンパク等の植物性タンパク質や、豆乳、果汁（オレンジ果汁、グレープ果汁、りんご果汁、さくら果汁）、ハーブティー、ハーブ抽出物等の植物抽出物、及び、果汁飲料、ワイン、茶、紅茶、ココア等、上記材料の加工物。

「植物性蛋白質」とは、上記「植物材料」から得られる蛋白質を意味し、植物材料由来の他の成分が混合していてもよい。

本発明において、「ファイトケミカル、ファイトエストロゲン、ポリフェノール、イソフラボン、ビオカニンA、ホルムオノネチン、クメストロール、リグナンからなる群から選択される化合物」は、これらの概念に含まれる化合物である限り特に限定されないが、好ましくは生体内において（好ましくは温血動物、さらに好ましくはヒト）、生理活性を示す、あるいは、生理活性を増強する化合物が好ましい。好ましくはフラボノイドであり、更に好ましくはイソフラボンであり、もっとも好ましくは前記構造式で示されるイソフラボンである。

本発明で「生理活性物質」とは、好ましくは植物内でその多くが配糖体として存在し、アグリコン型に変換されることで生体内で生理活性を示す、あるいは、生理活性を増強する物質を意味する。具体的には、生理活性物質としては、上記のように、ファイトケミカル、ファイトエストロゲン、ポリフェノール、イソフラボン、ビオカニンA、ホルムオノネチン、クメストロール、リグナン等が含まれ、好ましくは、イソフラボンである。

「配糖体型の生理活性物質」とは、上記配糖体のアグリコンが生理活性物質であることを意味し、糖鎖としては1糖以上、好ましくは2糖以上のものである。2糖鎖としては、前記のもの等が挙げられる。

本発明で「アミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、 α -グルコシダーゼ及び酵母溶解性酵素からなる群より選ばれた少なくとも1種の酵素を主体として含む酵素剤」とは、これらの酵素を主体として含む限り特に限定されず、市販の酵素剤を利

用することが可能である。以下、天野エンザイム（株）製のものを例示する。アミラーゼの例としては、アミラーゼAD「アマノ」1（最適pH：6.0、最適温度：70℃）、グルコザイムNL4. . 2（最適pH：4.5、最適温度：65℃）、トランスグルコシダーゼL「アマノ」（最適pH：5.0、最適温度：60℃）等が挙げられ、セルラーゼとしては、セルラーゼA「アマノ」3（最適pH：4.5、最適温度：55℃）、セルラーゼT「アマノ」4、ヘミセルラーゼ「アマノ」90G（最適pH：4.5、最適温度：50℃）、ヘミセルラーゼGM「アマノ」等が挙げられ、ペクチナーゼとしては、ペクチナーゼPL「アマノ」（最適pH：4.55～0、最適温度：60～55℃）等が挙げられ、プロテアーゼとしては、ウマミザイム、ニューラーゼF3G、パバインW-40、パンクレアチンF、プロテアーゼB、プロテアーゼA「アマノ」G等が挙げられ、リパーゼとしては、リパーゼA「アマノ」6（最適pH：6.5、最適温度：45℃）等が挙げられ、酵母溶解性酵素としては酵母溶解性酵素製剤YL-15（最適pH：7.0、最適温度：50～55℃）、 α -ガラクトシダーゼとしては、ADG-S-DS（最適pH：4.5～5、最適温度：50～60℃）などがあげられる。

上記各酵素乃至酵素製剤は、公知の方法で製造できる。例えば、上記特定の酵素を生産する微生物をジグリコシダーゼの製造と同様なスクリーニングを行い、得られた酵素産生菌を適当な培地で培養して、酵素を得ることができる。例えば、上記酵素の産生菌としては、バシラス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリザ (*Aspergillus oryzae*)、トリコデルマ・ヴィリデ (*Trichoderma viride*)、リゾプス・ニヴェウス (*Rhizopus niveus*)、シュドモナス・sp (*Pseudomonas sp.*) 等が挙げられる。

以下、本発明の蛋白質又は蛋白質含有食品にジグリコシダーゼを作用させる工程を含むアグリコン含量を高めた蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法について、植物材料由来の植物性生理活性成分（特にイソフラボン配糖体）を例にして、本発明を更に詳しく説明するが、本発明は植物材料由来の植物性生理活性成分以外の上記化合物

についても同様に実施できる。なお、本明細書において使用する大豆材料という用語は、大豆または大豆の変種のあらゆる型のことを意味する。

本発明の具体的実施方法のいくつかの異なる様態が可能である。

第一の様態においては、植物性生理活性物質を植物性材料中に残したまま、配糖体型の植物性生理活性物質をアグリコン型の植物性生理活性物質へ転換する。それゆえ、生成したアグリコン型の植物性生理活性物質は植物性材料中に残ったままであっても良く、適宜取り除いても良い。植物性生理活性物質のアグリコン形態は一般的に溶媒、疎水性の浸出または抽出方法により取り除くことができると考えられる。この操作に適した溶媒には、アセトン、エタノールおよびその他の類似した有機溶媒が含まれるが、これらに限定されない。

第二の様態においては、植物性材料中で配糖体型の植物性生理活性物質（例えば、イソフラボン修飾配糖体およびイソフラボングルコシド）を植物性材料中から、水性浸出または抽出方法により取り除く。水性浸出は、植物材料を浸漬するか、植物性材料を水または例えばエタノールもしくはその他のアルコールなどの親水性溶媒の混合物中にさらすか浸すことで比較的可溶性の配糖体型の植物性生理活性物質を浸出させることにより行われる。得られた水系のpHは、約pH 2から約pH 5であり、好ましくは、約pH 4である。取り除いた後、配糖体型の植物性生理活性物質をアグリコン型の植物性生理活性物質に転換する。

第三の様態においては、あらゆる転換操作を行う前に、配糖体型の植物性生理活性物質を植物性材料中から取り除く。

配糖体型の植物性生理活性物質を含む植物材料の型によっては、ある場合においては、植物材料が細かく砕かれた形態に加工することが好ましい。この事は、植物材料中に含まれる植物性生理活性物質を、以下に詳細に述べる工程において利用する試薬（ジグリコシダーゼ）に接触する為に望ましい。材料を、当該技術分野において既知の通常の方法によりすりつぶす、破碎またはその他の加工を施しても良い。もし植物材料が、植物材料中のイソフラボン化合物が外部の試薬または反応物に容易に接触する状態にある、例えばある植物における小さな葉の部分などであるならば、植物材料を前記の加工に付する必要はない。

配糖体型の植物性生理活性物質のアグリコン型の植物性生理活性物質への転換の一部は、使用する植物材料によっては、混合物中に存在する酵素によって行われることがある。これらの酵素は植物性蛋白質材料中に天然に存在するものであっても良く、材料中で増殖した微生物由来のものであっても良い。このような酵素を残留性酵素と呼ぶ。しかしながら、植物性蛋白質材料中の残留性酵素の性質および濃度では、配糖体型の植物性生理活性物質からアグリコン型の植物性生理活性物質への転換を充分に行うことができない可能性がある。外来の酵素、即ちジグリコシダーゼを含む酵素剤を添加することにより、最大のアグリコン型の植物性生理活性物質転換効率を達成することが可能となる。

本発明において、添加する酵素量は、存在する酵素のタイプ、酵素濃度の分布、反応系のpH、存在する酵素の活性および温度を含む種々の因子に依存する。酵素を添加する場合には、存在する酵素の全濃度が乾燥質量基準で植物性材料100gに対して通常、10~10000AU、好ましくは28~2800AUになる量が、典型的に好ましい酵素量である。残留性酵素、追加の酵素または両者を経て、充分な濃度の酵素が系中に存在するならば、配糖体型の植物性生理活性物質を、混合物中の配糖体型の植物性生理活性物質の実質的にすべてをアグリコン型の植物性生理活性物質に転換するのに充分な温度、pHおよび時間で接触させる。

転換・製造工程はpH約2から約6で行うことが好ましい。転換・製造工程により望ましいpH範囲は約3から約5である。使用する植物性素材に依存して、塩酸、リン酸、酢酸、硫酸等の酸性試薬、または水酸化ナトリウムのようなアルカリ性試薬によりpHを調整しても良い。多くの場合においては、食品グレードの酸性・アルカリ性試薬を使用することが想定される。転換・製造工程に使用できる温度は約25℃から約65℃が好ましい。より好ましい温度としては約30℃から約55℃である。反応を通じて温度は、通常一定であるが、利用する素材、その後の工程や最終的な使用目的に応じて、温度を上昇させたり、降下させることも考えられる。即ち、その場の諸事情に併せて比較的自由に變更させることが可能となる。

転換・製造に必要な時間は、反応に供する素材の種類、濃度、物理的特性、そして添加した酵素濃度、更に反応系の温度・pHなどの種々の因子が複雑に関係しあって

決定される。ほとんどの場合、6から12時間以内に実質的に完全な転換・製造を達成することができる。転換・製造を行う為に必要な時間は、添加するジグリコシダーゼ剤の濃度に依存して短縮することができる。転換工程・製造では、反応混合物中のイソフラボン配糖体の大部分をアグリコンイソフラボンに転換・製造することができる。転換の効率は、通常少なくとも約50%以上で、好ましくは約70%以上である。前記の好ましい反応条件を採用することにより、ほぼ完全な転換を達成することができる。

本発明の、ジグリコシダーゼを、ファイトエストロゲン、ポリフェノール、イソフラボン、ビオカニンA、ホルムオノネチン、クメストロール及びリグナンからなる群から選択される化合物をアグリコンとする配糖体へ作用させてアグリコンを生成させることを特徴とするアグリコンの製造方法についても、上記と同様の条件を採用することで実施可能である。

上記の工程に加えて、本発明においては、アミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、 α -グルコシダーゼ及び酵母溶解性酵素からなる群より選ばれた少なくとも1種の酵素を主体として含む酵素剤を作用させる工程をさらに含んでもよい。この工程はジグリコシダーゼを作用させる工程の前や後に行ってもよいし、ジグリコシダーゼと酵素剤を同時に作用させてもよい。この場合、酵素剤をジグリコシダーゼと同時用いる場合の処理条件は、前記ジグリコシダーゼ単独の場合に準じて行うことができる。また、酵素剤の処理をジグリコシダーゼの処理に前段または後段で行う場合には上記各酵素剤の最適pHおよび最適温度を勘案して適宜pH、温度、処理時間等を選定すればよい。この方法は蛋白質又は該蛋白質含有食品のアグリコン含量を高めることができ、また苦味及び／又は収斂味を低減し、風味を改善するという効果もある。

また、本発明は上記ジグリコシダーゼとの併用効果を見出す過程で、特定の酵素剤、即ちアミラーゼ、セルラーゼ、ヘクチナーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、 α -グルコシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ及び酵母溶解性酵素からなる群より選ばれた少なくとも1種の酵素を主体として含む酵素剤を単独に蛋白質又は蛋白質含有食品に作用させると風味が改善されることを見出した。この場合の処理条

件は、pHは好ましくは3～8、より好ましくは5～7.5であり、処理温度および処理時間はジグリコシダーゼ併用の場合と同様である。尚、処理されたものを適宜所望のpHに調整することは任意に選定できる。

以上のようにして、蛋白質又は蛋白質含有食品を処理することで、蛋白質や蛋白質含有食品の風味を改善することができ、特に苦み及び／又は収斂味の低減が可能である。

また、上記のように製造されたアグリコン型の植物性生理活性物質やアグリコン型植物性生理活性物質に富む組成物を、そのまま、あるいは、食物や飲料に混合して投与することで、植物性生理活性物質による効果等を得ることができる。植物性生理活性物質による効果としては、各種疾病（ガン、生活習慣病、骨粗鬆症、更年期障害におけるホテリなど）への予防効果、整腸作用、免疫賦活作用、生体防御増強作用、また、アグリコン型にあらかじめ変換された植物性生理活性物質を投与する以外にも、配糖体型の植物性生理活性物質及び／又は配糖体型の植物性生理活性物質を含有する植物材料をジグリコシダーゼとともに経口投与することで、胃や腸内などの生体内で配糖体型の植物性生理活性物質からアグリコン型の植物性生理活性物質の変換を行い、アグリコン型の植物性生理活性物質の吸収と血中への移行を促進し、植物性生理活性物質による各種疾病への予防効果を高める事ができる。

本発明による、配糖体型の植物性生理活性物質を含有する食物の摂取前、摂取中、及び／又は摂取後に、ジグリコシダーゼを経口投与することを特徴とする植物性生理活性物質の生体吸収の促進方法（好ましくは生体内でのイソフラボンをアグリコンとする配糖体からイソフラボンを生成する方法）は以下のように実施される。

対象は温血動物であり、好ましくはヒトや家畜である。

胃腸内で配糖体型の植物性生理活性物質とジグリコシダーゼが接触する限り、ジグリコシダーゼは配糖体型の植物性生理活性物質を含有する食物の摂取前、摂取中、摂取後のいずれに投与してもよい。好ましくは食事直後から1時間後である。

ジグリコシダーゼの投与量は、配糖体型の植物性生理活性物質からアグリコン型の植物性生理活性物質への変換が体内で起きれば特に限定されないが、通常10mg／日から500mg／日、好ましくは、30mg／日から300mg／日さらに好まし

くは、100mg/日から200mg/日の範囲で経口投与される。投与回数は特に限定されないが、数日に1回から一日数回が好ましく、特に好ましくは、毎食後（一日3回）である。

また、生理活性物質の摂取量は、その効果が得られれば特に限定されないが、好ましくは10mg/日以上、さらに好ましくは、50mg/日以上、さらに好ましくは、50mg/日から100mg/日の範囲で摂取される。

また、ジグリコシダーゼは単独で、酵素剤として、及び/又は、既存のグリコシダーゼ（例えばグルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ等）と混合し投与することができる。

ジグリコシダーゼは酵素剤として使用することもできる。この場合、酵素剤は、必須成分としてジグリコシダーゼを含有し、さらに、好ましくは食品として許容される種々の酵素、安定化剤、等を含んでよい。

また、既存のグリコシダーゼと混合した酵素剤として投与する場合、既存のグリコシダーゼの例としては、グルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、キシロシダーゼ、ラムノシダーゼ、また、ジグリコシダーゼの投与量としては10mg/日から50mg/日が好ましい。

図面の簡単な説明

図1は実施例7の結果を示すグラフである。図2は実施例8の結果を示すグラフである。図3は実施例14の結果を示すグラフである。図4は実施例15の結果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

植物材料として大豆素材を使用した実施例を以下に示すことにより、本発明を更に詳細に説明する。実施例は、あくまでも説明を目的としたものであり、これが本発明の範囲を制限・限定するものでは決してないものとして捉えられなければならない。

植物材料、例えば脱脂大豆、豆乳、濃縮大豆蛋白質および各種大豆製品は、12種類のイソフラボン化合物を含む。具体的には、アグリコンであるグリシテイン、ダイゼイン、ゲニステイン、グルコシド配糖体であるグリシチン、ダイズイン、ゲニスチ

ン、グルコース残基の6位にO-アセチル基を持つアセチルグリシチン、アセチルダイズイン、アセチルゲニスチン、グルコース残基の6位にO-マロニル基を持つマロニルグリシチン、マロニルダイズイン、マロニルゲニスチンを含む。これら化合物の存在比は、大豆の品種の違い、製造工程における処理の違いによってそれぞれに特徴的なものとなる。

特に指摘がない限り、本願明細書において比率、部、パーセント等は質量基準である。

なお、本明細書において各種酵素活性測定は特に記載しないかぎり、以下に記載する方法により行った値で表示する。

ジグリコシダーゼ活性

活性の測定は自動化学分析装置（東芝社製、TBA-30R）を用いて行った。酵素サンプル30 μ Lと二糖配糖体基質としてパラニトロフェニル（pNP）プリメベロシドを2mMに酢酸緩衝液（pH5.5）に溶解せしめたもの200 μ Lと混合し、40℃、サイクルタイム22.5sec.で9.75分間反応させた後、炭酸ナトリウム250 μ Lを加え412nmの吸光度を測定した。サンプル由来のブランクの測定は基質溶液の代わりに20mM酢酸緩衝液（pH5.5）を用いて同様に測定した。

この条件下で吸光度を1上昇させる酵素量を1AUとした。

ここで用いたpNP-プリメベロシドは、例えばpNP-グルコシド（メルク社製）とキシロオリゴ糖（和光純薬社製）を酵素キシロシダーゼ（シグマ社製）を用いて反応させ、pNP-グルコシドにキシロースを β -1,6結合で1残基転移させることにより合成できる。

【0001】

実施例1（ペニシリウム マルタイカラー（*Penicillium multicolor*）IAM7153によるジグリコシダーゼの製造）

ジグリコシダーゼの培養

2.0%の脱脂大豆、3.0%ブドウ糖、0.5%リン酸二水素カリウム、0.4%硫酸アンモニウム、0.3%乾燥酵母を含む生育培地（pH5.6）を121℃で2

0分間殺菌した。殺菌した培地100mLに対してペニシリウム マルタイカラー (*Penicillium multicolor*) IAM7153を1エーゼ接種し、27℃、140min⁻¹の振とう速度で前培養を行った。5日後、1.0%サンファイバーR、2.0%リン酸二水素カリウム、1.0%硫酸アンモニウム、3.13%ミーストP1Gを含むpH4.9の本培地20Lを30L容のジャーファーマンターにて、150min⁻¹で攪拌しながら121℃で20分間殺菌した。前培地を1.5%で接種し、攪拌数250min⁻¹、通気量0.75vvm (15L/min)、内圧0.5Kg/cm² (48kPa)、27±1℃で8日間培養した。

ジグリコシダーゼの精製

培養ブロスに濾過助材としてゼムライトスーパー56MとファインフローAをそれぞれ全液量の2%質量を添加し、珪藻土ろ過を行った。限外濾過膜 UF AIP-2020 (MW6,000) で20倍濃縮を行うとともに、pH4.7の20mM酢酸緩衝液で置換した。上記限外濾過濃縮液に硫酸アンモニウムを添加し、50%硫酸塩析を行った。得られた沈殿を除去し、上清に更に硫酸を添加して80%硫酸塩析を行った。沈殿を回収し、pH4.7の20mM酢酸緩衝液に溶解した。溶解液を10-DGカラム (BioRad Co.) に通し、緩衝液を30%飽和硫酸アンモニウムを含むpH4.7の20mM酢酸緩衝液に交換した (この溶液を以下「粗ジグリコシダーゼ」ともいう。)。この溶液を疎水クロマトグラフィー (HiLoad 16/10 Phenyl Sepharose High Performance (Pharmacia)) にアプライし、ジグリコシダーゼ活性を示す画分をβ-グルコシダーゼおよびβ-キシロシダーゼ活性の画分と分離させた。室温にて、2mL/minの流速で30%飽和硫酸を含む20mM酢酸緩衝液で溶出を開始し、30-0%の直線勾配によって溶出した。10-12.5%飽和硫酸濃度でジグリコシダーゼ活性を示す画分が溶出された。回収したジグリコシダーゼ画分を濃縮し、遠心分離した上清を10-DGカラムにかけて溶解液をpH7.1の25mMトリス塩酸緩衝液に交換した。この液を等電点クロマトグラフィー (Mono-P HR5/20 (Pharmacia)) にアプライし、pH5.0のポリバッファー74で1mL/min、室温で溶出を開始した。目的のジグリコシダーゼ活性は、pH6.2から

pH 6.3で溶出した。この画分のSDS電気泳動でシングルバンドが得られたことから、ジグリコシダーゼ（以下「精製ジグリコシダーゼ」ともいう。）が精製できたことが示された。

実施例2（各種イソフラボン配糖体に対するジグリコシダーゼの反応性）

ジグリコシダーゼをpH 4.0の酢酸緩衝液で希釈して0.75 AU/mLの酵素液を調整した。比較として、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*) 由来の β -グルコシダーゼ (Fluka社製) あるいはアーモンド由来の β -グルコシダーゼ (Sigma社製)、ヘクチナーゼG (天野エンザイム株式会社製) より精製した β -キシロシダーゼも同様に行った。イソフラボン配糖体の精製品 (グリシチン、アセチルグリシチン、マロニルグリシチン、ダイズイン、アセチルダイズイン、マロニルダイズイン、ゲニスチン、アセチルゲニスチン、マロニルゲニスチン、全てナカライテスク株式会社製) をメタノールに溶解して2 mMの各基質溶液を調製した。基質溶液10 μ L、20 mM酢酸緩衝液 (pH 4.0) 200 μ L、各精製酵素液40 μ Lを混合し、全液量250 μ Lで反応を行った。55°Cで反応させ、反応0、1、3、6時間の反応液中のイソフラボン配糖体からのアグリコンイソフラボンの遊離をHPLCにより検出した。

HPLC分析

反応液にエタノールを700 μ L添加し、攪拌、超音波処理を施し、15,000 rpm、4°Cで10分間遠心分離後、上清をフィルターろ過してHPLCに供した。

該ろ液に含まれるイソフラボン配糖体及びアグリコンイソフラボンを、TOSOH TSK gel ODS-80 TMカラム (東ソー株式会社製) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC、Shimadzu CLASS LC-10システム) により、分離・検出した。イソフラボン配糖体及びアグリコンイソフラボンを含む該ろ液をオートインジェクター (Shimadzu, SIL-10 AXL) によりカラムに注入し、溶離液A (アセトニトリル) と溶離液B (10%酢酸溶液) をそれぞれ2%、98%含む溶液で開始し、5分後から溶離液A 50%、溶離液B 50%で終了する直線濃度勾配を用いて溶離した。全流速は0.8 mL/minで、12種類のイソフラボン配糖体及びアグリコンイソフラボン、即ち、グリシチン、ダイズイン、

ゲニスチン、6''-O-アセチルグリシチン、6''-O-アセチルダイズイン、6''-O-アセチルゲニスチン、6''-O-マロニルグリシチン、6''-O-マロニルダイズイン、6''-O-マロニルゲニスチン、グリシテイン、ダイゼイン、ゲニステインが分離可能である。260nmにおける吸光度をUV検出器（Shimadzu, SPD-10AV）により検出した。標準化合物として、上記イソフラボン配糖体及びアグリコンイソフラボンの精製品（ナカライテスク株式会社製）を用いて検量線法により、イソフラボン配糖体及びアグリコンイソフラボンを定量した。尚、特に断らない限り、本願明細書のHPLCの測定条件は、該実施例に記載のものを意味する。

その結果、アスペルギルス ニガー（*Aspergillus Niger*）由来の β -グルコシダーゼは、グリシチン、ダイズイン、ゲニスチンの3種のグルコシドイソフラボンに対して良く作用する事ができたが、修飾配糖体に対しての反応性は非常に低かった。植物由来の β -グルコシダーゼは、グルコシドイソフラボンを分解するが効率が低く、修飾グルコシドイソフラボンに対しては全く作用できなかった。一方、ジグリコシダーゼは、全てのイソフラボン配糖体を非常に高い効率で切断する事ができた。中でも、アセチルグルコシドイソフラボンに対する分解効率が高かった。以上の結果から、ジグリコシダーゼはイソフラボン配糖体からアグリコンイソフラボンを非常に効率よく切断することがわかった（表1）。

また本酵素に更に β -グルコシダーゼを併用することにより、イソフラボングルコシド、特にゲニスチンの分解効率をさらに上げることが可能となることも判明した。

表1

精製酵素	基質	反応時間 (h)											
		0			1			3			6		
		グルコシド	アグリコン	グルコシド	アグリコン	グルコシド	アグリコン	グルコシド	アグリコン	グルコシド	アグリコン	グルコシド	アグリコン
P. マルタイカラー由来ジグリコシダーゼ	グリシチン	100	0	2.1	97.9	0.2	99.8	0.3	99.7	0.3	99.7	0.3	99.7
	ダイズイン	99.1	0.9	29.9	70.1	18.2	81.8	11.5	88.5	11.5	88.5	11.5	88.5
	ゲニスチン	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
	マロニルグリシチ	100	0	21.7	78.3	15.5	84.5	14	86	14	86	14	86
	マロニルダイズイ	100	0	49.2	50.8	39.9	60.1	38.5	61.5	38.5	61.5	38.5	61.5
	マロニルゲニスチ	100	0	25.8	74.2	17.9	82.1	17.7	82.3	17.7	82.3	17.7	82.3
	アセチルグリシチ	100	0	2	98	2.1	97.9	2.5	97.5	2.5	97.5	2.5	97.5
	アセチルダイズイ	100	0	10.4	89.6	3.8	96.2	3.8	96.2	3.8	96.2	3.8	96.2
	アセチルゲニスチ	100	0	0.2	99.8	0.1	99.9	0.2	99.8	0.2	99.8	0.2	99.8
	グリシチン	100	0	99.5	0.5	100	0	100	0	100	0	100	0
A. フミガタス由来のジグリコシダーゼ	ダイズイン	99.1	0.9	92.9	7.1	85.3	14.7	75.2	24.8	75.2	24.8	75.2	24.8
	ゲニスチン	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
	マロニルグリシチ	100	0	99.6	0.4	99.2	0.8	98.6	1.4	98.6	1.4	98.6	1.4
	マロニルダイズイ	100	0	90	10	79.5	20.5	67.7	32.3	67.7	32.3	67.7	32.3
	マロニルゲニスチ	100	0	97.6	2.4	94.8	5.2	91.8	8.2	91.8	8.2	91.8	8.2
	アセチルグリシチ	100	0	94	6	86.5	13.5	77.3	22.7	77.3	22.7	77.3	22.7
	アセチルダイズイ	100	0	73.9	26.1	52.8	47.2	33.5	66.5	33.5	66.5	33.5	66.5
	アセチルゲニスチ	100	0	87.4	12.6	77.1	22.9	64.8	35.2	64.8	35.2	64.8	35.2
	グリシチン	100	0	99.2	0.8	97.6	2.4	95.5	4.5	95.5	4.5	95.5	4.5
	ダイズイン	99.1	0.9	90.9	9.1	76	24	57.9	42.1	57.9	42.1	57.9	42.1
ベクチナーゼGより精製した β -キシロシダーゼ	ゲニスチン	100	0	98.5	1.5	98.2	1.8	98.2	1.8	98.2	1.8	98.2	1.8
	マロニルグリシチ	100	0	100	0	100	0	99.6	0.4	99.6	0.4	99.6	0.4
	マロニルダイズイ	100	0	99.6	0.4	98.4	1.6	96.7	3.3	96.7	3.3	96.7	3.3
	マロニルゲニスチ	100	0	100	0	99.4	0.6	98	2	98	2	98	2
	アセチルグリシチ	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
	アセチルダイズイ	100	0	90.3	9.7	98.7	1.3	97.7	2.3	97.7	2.3	97.7	2.3
	アセチルゲニスチ	100	0	100	0	99.8	0.2	99.5	0.5	99.5	0.5	99.5	0.5
	グリシチン	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
	ダイズイン	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
	ゲニスチン	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0

表1(続き)

精製酵素	基質	反応時間 (h)					
		0		1		3	
		グルコシド	アグリコン	グルコシド	アグリコン	グルコシド	アグリコン
A. ニガー由来の β -グルコシダーゼ	グリシチン	100	0	50.5	49.5	11.7	88.3
	ダイズイン	100	0	0	100	0	100
	ゲニスチン	100	0	0	100	0	100
	マロニルグリシチン	100	0	98.8	1.2	95.6	4.4
	マロニルダイズイン	100	0	95.5	4.5	90.7	9.3
	マロニルゲニスチン	100	0	96.9	3.1	93	7
	アセチルグリシチン	100	0	100	0	99	1
	アセチルダイズイン	100	0	95.6	4.4	93.6	6.4
	アセチルゲニスチン	100	0	98.6	1.4	96.7	3.3
	グリシチン	100	0	98.4	1.6	98.1	1.9
アーモンド由来の β -グルコシダーゼ	ダイズイン	99.1	0.9	90.9	9.1	89.2	10.8
	ゲニスチン	100	0	90.6	9.4	88.6	11.4
	マロニルグリシチン	100	0	100	0	100	0
	マロニルダイズイン	100	0	100	0	100	0
	マロニルゲニスチン	100	0	100	0	100	0
	アセチルグリシチン	100	0	100	0	100	0
	アセチルダイズイン	99.8	0.2	99.5	0.5	99.4	0.6
	アセチルゲニスチン	100	0	100	0	100	0
	グリシチン	100	0	100	0	100	0
	ダイズイン	100	0	100	0	100	0

実施例3（遊離グルコースのジグリコシダーゼ活性への影響）

精製ジグリコシダーゼをpH 4.0の20mM酢酸緩衝液で希釈して0.75AU/mLの酵素液を調製した。

実施例2に記載の各2mM基質溶液10 μ Lとグルコース溶液を混合し、pH 4.0の20mM酢酸緩衝液を添加して液量を210 μ Lとした。更に酵素液40 μ Lを添加して、最終液量を250 μ Lとして反応を行った。添加するグルコース溶液を調節して、反応液中にグルコースを0-20%の範囲で共存させた。55℃で反応を行い、反応0、0.5、1、3時間でのイソフラボン配糖体とアグリコンイソフラボンの存在をHPLCにて分析した。

グルコース濃度0%時、反応0.5時間における各イソフラボン配糖体を基質としたときに遊離したアグリコン量を100%として比較すると、ジグリコシダーゼのアグリコンイソフラボン転換効率は遊離グルコース濃度の上昇によってほとんど阻害を受けないことがわかった。逆に8%グルコース濃度までは転換効率の上昇が観察された。したがってジグリコシダーゼのアグリコンイソフラボン転換反応においては20%までの濃度のグルコースによる阻害は観察されなかった（表2）。

また、従来のアグリコンイソフラボン転換法に用いられる β -グルコシダーゼはグルコースによる阻害を受け、反応効率の大幅な低下が観察されるのに対して、本発明のジグリコシダーゼについてはグルコースによる阻害が殆どないことが判明した。従って、既存のグリコシダーゼではアグリコンイソフラボンへの転換の原料である植物性素材の使用量・種類および使用法が制限されるが、本発明のジグリコシダーゼではかかる制限がなく、イソフラボンアグリコンへの転換の効率が著しく向上する。

表2 . グルコース共存下でのジグリコシダーゼによるイソフラボンアグリコンの遊離

グルコース 濃度(%)	イソフラボン配糖体							
	グリシチン	ダイズイン	アセチルグリシチン	アセチルゲニスチン	アセチルダイズイン	マロニルグリシチン	マロニルゲニスチン	マロニルダイズイン
0	100	100	100	100	100	100	100	100
2	96	128.1	100.9	104.1	108.1	121.4	152	125.3
4	99.7	126	100.9	104.1	112.2	127.6	164.7	132.1
8	100.1	129.1	100.9	104.1	115.8	128.6	163.5	125.4
20	92.8	111.9	100.9	104.1	114.5	116.4	139.5	98.1

実施例4（大豆素材を用いた、ジグリコシダーゼによるイソフラボンアグリコンへの転換における温度の検討）

各種大豆素材（きな粉（富士食糧株式会社製）、豆乳（ギトー食品株式会社製）、脱脂大豆（不二製油株式会社製）、濃縮大豆タンパク質（不二製油株式会社製））50mgをpH4.0の20mM酢酸緩衝液400 μ Lに懸濁し、基質溶液を調製した。粗ジグリコシダーゼをpH4.0の20mM酢酸緩衝液で希釈してジグリコシダーゼ活性を1.88AU/mLとした。この酵素液50 μ Lと基質溶液を混合し、全量500 μ Lとして80、65、55、45、37あるいは30℃で反応させた。反応0、1、3、6時間後の反応液にエタノールを700 μ L添加した。攪拌、超音波処理を施し、15,000rpm、4℃で10分間遠心分離した。上清をフィルターろ過して反応液中に含まれるイソフラボン配糖体およびアグリコンイソフラボンの存在をHPLCにより検出した。

4種類の大豆素材（きな粉、豆乳、濃縮大豆蛋白質、脱脂大豆）に酵素を作用させたときのジグリコシダーゼ活性を含む酵素剤によるイソフラボン配糖体のアグリコンイソフラボンへの分解効率をイソフラボン化合物を3つの群に分けて調べた。即ち、グリシチンファミリー（グリシチン、マロニルグリシチン、アセチルグリシチン、グリステイン）、ゲニスチンファミリー（ゲニスチン、マロニルゲニスチン、アセチルゲニスチン、ゲニステイン）、そしてダイズインファミリー（ダイズイン、マロニルダイズイン、アセチルダイズイン、ダイゼイン）の3群について転換効率を解析した（表3～14）。

表3. きな粉におけるグリシチンファミリーの分解効率

反応温度 (℃)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン
			グリシチン	マロニルグリシチン	アセチルグリシチン	グリシテイン
30	なし	0	50.9	検出せず	38.7	10.4
		1	34.8	検出せず	33.8	31.5
		3	検出せず	検出せず	33.2	66.8
		6	検出せず	検出せず	19.1	80.9
	あり	6	51.4	検出せず	37.5	11.1
45	なし	0	51.3	検出せず	38.3	10.4
		1	12.4	検出せず	27.4	60.2
		3	12.4	検出せず	20.3	67.4
		6	5.9	検出せず	9.1	85.0
	あり	6	49.8	検出せず	36.8	13.4
55	なし	0	50.5	検出せず	39.1	10.4
		1	検出せず	検出せず	30.1	69.9
		3	検出せず	検出せず	12.1	87.9
		6	検出せず	検出せず	6.0	94.0
	あり	6	51.7	検出せず	37.3	11.0
65	なし	0	50.9	検出せず	38.7	10.4
		1	検出せず	検出せず	34.5	65.5
		3	検出せず	検出せず	31.0	69.0
		6	検出せず	検出せず	29.0	71.0
	あり	6	50.3	検出せず	39.3	10.4
80	なし	0	51.3	検出せず	38.3	10.4
		1	19.2	検出せず	40.1	40.8
		3	20.5	検出せず	38.4	41.1
		6	33.6	検出せず	35.7	30.7
	あり	6	50.6	検出せず	39.4	9.9

表 4 きな粉におけるゲニスチンファミリーの分解効率

反応温度 (°C)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン ゲニステ イン
			ゲニスチン	マロニルゲニスチン	アセチルゲニスチン	
30	なし	0	49.7	検出せず	45.5	4.9
		1	25.7	検出せず	45.3	29.0
		3	12.0	検出せず	43.8	44.2
		6	5.5	検出せず	40.6	53.8
	あり	6	50.3	検出せず	43.8	5.8
45	なし	0	50.2	検出せず	45.3	4.4
		1	3.7	検出せず	43.6	52.7
		3	5.6	検出せず	38.5	55.9
		6	1.2	検出せず	31.7	67.1
	あり	6	51.7	検出せず	39.5	8.8
55	なし	0	49.7	検出せず	45.7	4.6
		1	1.2	検出せず	42.5	56.2
		3	検出せず	検出せず	34.0	66.0
		6	検出せず	検出せず	27.3	72.7
	あり	6	54.0	検出せず	39.9	6.2
65	なし	0	49.7	検出せず	45.5	4.9
		1	検出せず	検出せず	43.6	56.4
		3	検出せず	検出せず	40.5	59.5
		6	検出せず	検出せず	38.8	61.2
	あり	6	50.7	検出せず	44.3	5.0
80	なし	0	50.2	検出せず	45.3	4.4
		1	7.8	検出せず	48.5	43.6
		3	9.1	検出せず	48.2	42.7
		6	18.4	検出せず	47.7	33.9
	あり	6	52.2	検出せず	43.4	4.3

表5 きな粉におけるダイズインファミリーの分解効率

反応温度 (℃)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン ダイゼイン
			ダイズイン	マロニルダイズイン	アセチルダイズイン	
35	なし	0	48.6	検出せず	47.8	3.6
		1	11.7	検出せず	46.9	41.4
		3	検出せず	検出せず	45.3	54.7
		6	検出せず	検出せず	39.6	60.4
	あり	6	50.3	検出せず	43.8	5.8
45	なし	0	48.6	検出せず	47.7	3.7
		1	3.6	検出せず	42.9	53.5
		3	2.7	検出せず	37.9	59.4
		6	5.4	検出せず	28.5	66.2
	あり	6	49.4	検出せず	42.5	8.1
55	なし	0	48.8	検出せず	47.5	3.7
		1	検出せず	検出せず	42.8	57.2
		3	検出せず	検出せず	32.5	67.5
		6	検出せず	検出せず	26.7	73.3
	あり	6	51.1	検出せず	43.6	5.3
65	なし	0	48.6	検出せず	47.8	3.6
		1	検出せず	検出せず	43.7	56.3
		3	検出せず	検出せず	40.2	59.8
		6	検出せず	検出せず	37.8	62.2
	あり	6	49.7	検出せず	46.1	4.2
80	なし	0	48.6	検出せず	47.7	3.7
		1	3.2	検出せず	49.1	47.7
		3	4.4	検出せず	47.9	47.7
		6	12.5	検出せず	46.7	40.8
	あり	6	51.3	検出せず	45.0	3.8

表6. 豆乳におけるグリシチンファミリーの分解効率

反応温度 (°C)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン
			グリシチン	マロニルグリシチン	アセチルグリシチン	グリシテイン
30	なし	0	43.9	48.0	検出せず	8.1
		1	検出せず	51.0	検出せず	49.0
		3	検出せず	39.6	検出せず	60.4
		6	検出せず	28.4	検出せず	71.6
	あり	6	44.5	47.7	検出せず	7.9
45	なし	0	42.6	49.1	検出せず	8.2
		1	検出せず	46.2	検出せず	53.8
		3	検出せず	29.9	検出せず	70.1
		6	検出せず	15.3	検出せず	84.7
	あり	6	45.4	47.2	検出せず	7.4
55	なし	0	47.8	44.6	検出せず	7.6
		1	検出せず	39.1	検出せず	60.9
		3	検出せず	27.7	検出せず	72.3
		6	検出せず	16.5	検出せず	83.5
	あり	6	53.5	39.9	検出せず	6.7
65	なし	0	43.9	48.0	検出せず	8.1
		1	検出せず	42.4	検出せず	57.6
		3	検出せず	34.3	検出せず	65.7
		6	検出せず	25.5	検出せず	74.5
	あり	6	56.8	36.0	検出せず	7.2
80	なし	0	42.6	49.1	検出せず	8.2
		1	10.7	43.6	検出せず	45.7
		3	22.5	32.6	検出せず	44.9
		6	44.2	21.3	検出せず	34.4
	あり	6	71.4	19.3	検出せず	9.3

表7. 豆乳におけるゲニスチンファミリーの分解効率

反応温度 (°C)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン
			ゲニスチン	マロニルゲニスチン	アセチルゲニスチン	ゲニステイン
30	なし	0	30.7	58.5	0.9	10.0
		1	検出せず	56.5	検出せず	43.5
		3	検出せず	47.9	検出せず	52.1
		6	検出せず	36.1	検出せず	63.9
	あり	6	31.2	57.7	0.9	10.1
45	なし	0	31.0	57.8	0.9	10.3
		1	検出せず	49.4	検出せず	50.6
		3	検出せず	34.7	検出せず	65.3
		6	検出せず	20.7	検出せず	79.3
	あり	6	34.4	57.2	0.6	7.9
55	なし	0	31.6	59.1	0.6	8.7
		1	検出せず	46.9	検出せず	53.1
		3	検出せず	32.5	検出せず	67.5
		6	検出せず	20.4	検出せず	79.6
	あり	6	37.4	53.3	0.7	8.6
65	なし	0	30.7	58.5	0.9	10.0
		1	検出せず	48.9	検出せず	51.1
		3	検出せず	40.6	検出せず	59.4
		6	検出せず	31.8	検出せず	68.2
	あり	6	44.4	44.6	1.1	9.9
80	なし	0	31.0	57.8	0.9	10.3
		1	10.6	50.4	0.9	38.0
		3	24.3	37.7	1.0	37.0
		6	43.9	24.1	2.3	29.6
	あり	6	64.5	22.9	2.5	10.1

表8. 豆乳におけるダイズインファミリーの分解効率

反応温度 (°C)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン ダイゼイン
			ダイズイン	マロニルダイズイン	アセチルダイズイン	
30	なし	0	34.1	56.8	検出せず	9.1
		1	検出せず	58.2	検出せず	41.8
		3	検出せず	52.8	検出せず	47.2
		6	検出せず	46.2	検出せず	53.8
	あり	6	34.8	56.1	検出せず	9.1
45	なし	0	33.9	57.2	検出せず	8.9
		1	6.8	50.2	検出せず	43.0
		3	6.9	41.1	検出せず	52.0
		6	6.9	30.2	検出せず	62.8
	あり	6	36.0	55.8	検出せず	8.2
55	なし	0	34.2	57.3	検出せず	8.6
		1	検出せず	50.9	検出せず	49.1
		3	検出せず	41.1	検出せず	58.9
		6	検出せず	31.1	検出せず	68.9
	あり	6	40.7	50.8	検出せず	8.6
65	なし	0	34.1	56.8	検出せず	9.1
		1	検出せず	51.7	検出せず	48.3
		3	検出せず	43.9	検出せず	56.1
		6	検出せず	35.3	検出せず	64.7
	あり	6	48.7	42.4	検出せず	8.8
80	なし	0	33.9	57.2	検出せず	8.9
		1	8.9	50.8	検出せず	40.3
		3	23.9	36.4	検出せず	39.7
		6	42.9	23.0	検出せず	34.1
	あり	6	69.5	21.8	検出せず	8.8

表.9 濃縮大豆蛋白質におけるグリシチンファミリーの分解効率

反応温度 (°C)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン グリシチン
			グリシチン	マロニルグリシチン	アセチルグリシチン	
30	なし	0	52.2	0.4	36.0	11.4
		1	47.1	0.5	35.0	17.5
		3	39.1	0.5	33.4	26.9
		6	28.4	0.5	30.8	40.3
	あり	6	52.8	0.4	35.4	11.3
45	なし	0	52.3	0.4	35.9	11.4
		1	30.2	0.6	34.1	35.2
		3	18.8	0.6	31.0	49.6
		6	7.5	0.6	27.1	64.9
	あり	6	53.2	0.5	35.0	11.3
55	なし	0	52.3	0.4	36.0	11.2
		1	14.2	0.5	33.9	51.4
		3	検出せず	0.5	29.8	69.7
		6	検出せず	0.5	26.8	72.7
	あり	6	52.9	0.4	35.3	11.3
65	なし	0	52.2	0.4	36.0	11.4
		1	5.2	0.5	35.7	58.6
		3	検出せず	0.5	35.5	64.0
		6	検出せず	0.4	35.8	63.8
	あり	6	52.5	0.4	35.7	11.4
80	なし	0	52.3	0.4	35.9	11.4
		1	39.7	0.4	36.0	23.8
		3	40.5	0.4	35.7	23.4
		6	41.7	0.3	35.2	22.8
	あり	6	53.6	0.3	34.8	11.4

表10. 濃縮大豆蛋白質におけるゲニスチンファミリーの分解効率

反応温度 (°C)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン ゲニステイン
			ゲニスチン	マロニルゲニスチン	アセチルゲニスチン	
30	なし	0	49.8	検出せず	43.1	7.1
		1	41.1	検出せず	43.2	15.7
		3	30.3	検出せず	43.0	26.7
		6	19.7	検出せず	42.5	37.8
	あり	6	51.8	検出せず	41.5	6.7
45	なし	0	49.7	検出せず	43.0	7.2
		1	22.2	検出せず	42.8	35.0
		3	15.6	検出せず	41.0	43.4
		6	5.3	検出せず	39.6	55.1
	あり	6	54.5	検出せず	38.9	6.5
55	なし	0	50.1	検出せず	42.9	7.0
		1	7.0	検出せず	43.1	49.8
		3	0.8	検出せず	41.1	58.1
		6	検出せず	検出せず	39.0	61.0
	あり	6	52.3	検出せず	41.1	6.6
65	なし	0	49.8	検出せず	43.1	7.1
		1	検出せず	検出せず	45.2	54.8
		3	検出せず	検出せず	44.0	56.0
		6	検出せず	検出せず	43.4	56.6
	あり	6	50.8	検出せず	42.3	6.9
80	なし	0	49.7	検出せず	43.0	7.2
		1	29.6	検出せず	44.0	26.4
		3	30.3	検出せず	43.6	26.1
		6	32.3	検出せず	43.4	24.3
	あり	6	51.9	検出せず	41.4	6.7

表11. 濃縮大豆蛋白質におけるダイズインファミリーの分解効率

反応温度 (°C)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン ダイゼイン
			ダイズイン	マロニルダイズイン	アセチルダイズイン	
30	なし	0	52.3	検出せず	44.6	3.0
		1	29.5	検出せず	44.4	26.2
		3	13.4	検出せず	43.9	42.7
		6	4.0	検出せず	43.5	52.5
		あり 6	54.5	検出せず	42.3	3.2
	あり 6	6	54.5	検出せず	42.3	3.2
45	なし	0	52.4	検出せず	44.5	3.1
		1	10.6	検出せず	44.1	45.3
		3	9.6	検出せず	41.5	48.8
		6	1.7	検出せず	42.9	55.5
		あり 6	94.3	検出せず	0.0	5.7
	あり 6	6	94.3	検出せず	0.0	5.7
55	なし	0	52.5	検出せず	44.5	3.0
		1	1.0	検出せず	44.0	55.0
		3	検出せず	検出せず	40.6	59.4
		6	検出せず	検出せず	37.7	62.3
		あり 6	54.6	検出せず	42.3	3.2
	あり 6	6	54.6	検出せず	42.3	3.2
65	なし	0	52.3	検出せず	44.6	3.0
		1	1.8	検出せず	44.3	53.9
		3	1.7	検出せず	42.9	55.4
		6	1.7	検出せず	41.6	56.7
		あり 6	53.2	検出せず	43.6	3.2
	あり 6	6	53.2	検出せず	43.6	3.2
80	なし	0	52.4	検出せず	44.5	3.1
		1	22.6	検出せず	45.5	31.9
		3	23.3	検出せず	44.7	32.0
		6	25.5	検出せず	43.8	30.7
		あり 6	54.5	検出せず	42.3	3.2
	あり 6	6	54.5	検出せず	42.3	3.2

表12. 脱脂大豆におけるグリシチンファミリーの分解効率

反応温度 (°C)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン グリシテイン
			グリシチン	マロニルグリシチン	アセチルグリシチン	
30	なし	0	検出せず	61.3	検出せず	38.7
		1	検出せず	48.3	検出せず	51.7
		3	検出せず	44.6	検出せず	55.4
		6	検出せず	45.6	検出せず	54.4
	あり	6	検出せず	45.1	検出せず	54.9
45	なし	0	検出せず	65.2	検出せず	34.8
		1	検出せず	44.3	検出せず	55.7
		3	検出せず	44.8	検出せず	55.2
		6	検出せず	41.0	検出せず	59.0
	あり	6	検出せず	44.2	検出せず	55.8
55	なし	0	検出せず	61.3	検出せず	38.7
		1	検出せず	44.8	検出せず	55.2
		3	検出せず	42.6	検出せず	57.4
		6	検出せず	42.7	検出せず	57.3
	あり	6	検出せず	45.5	検出せず	54.5
65	なし	0	検出せず	65.2	検出せず	34.8
		1	検出せず	45.3	検出せず	54.7
		3	検出せず	42.1	検出せず	57.9
		6	検出せず	40.0	検出せず	60.0
	あり	6	検出せず	48.8	検出せず	51.2
80	なし	0	検出せず	65.2	検出せず	34.8
		1	検出せず	46.1	検出せず	53.9
		3	検出せず	45.0	検出せず	55.0
		6	検出せず	40.3	検出せず	59.7
	あり	6	検出せず	48.1	検出せず	51.9

表13. 脱脂大豆におけるゲニスチンファミリーの分解効率

反応温度 (°C)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン
			ゲニスチン	マロニルゲニスチン	アセチルゲニスチン	ゲニステイン
30	なし	0	38.0	47.0	1.7	13.3
		1	検出せず	51.3	1.3	47.4
		3	検出せず	49.1	0.7	50.2
		6	7.6	45.6	0.1	46.6
	あり	6	検出せず	49.5	0.4	50.2
45	なし	0	37.0	47.0	1.5	14.5
		1	0.9	49.0	0.8	49.2
		3	1.0	46.8	0.3	51.8
		6	1.0	44.2	0.2	54.6
	あり	6	1.3	48.1	0.2	50.4
55	なし	0	38.0	47.0	1.7	13.3
		1	0.0	48.8	0.7	50.5
		3	0.0	46.1	0.2	53.7
		6	0.0	43.4	0.1	56.5
	あり	6	0.0	47.8	0.4	51.9
65	なし	0	37.0	47.0	1.5	14.5
		1	0.0	48.9	1.2	49.9
		3	1.8	45.2	1.2	51.8
		6	3.3	41.1	1.1	54.5
	あり	6	28.2	39.7	1.3	30.7
80	なし	0	37.0	47.0	1.5	14.5
		1	9.6	43.8	1.8	44.9
		3	22.1	32.5	2.1	43.3
		6	35.3	20.9	2.5	41.3
	あり	6	57.8	20.1	2.4	19.6

表14. 脱脂大豆におけるダイズインファミリーの分解効率

反応温度 (°C)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン ダイゼイン
			ダイズイン	マロニルダイズイン	アセチルダイズイン	
30	なし	0	42.2	43.3	検出せず	14.5
		1	検出せず	46.6	検出せず	53.4
		3	検出せず	45.2	検出せず	54.8
		6	検出せず	45.1	検出せず	54.9
	あり	6	検出せず	45.4	検出せず	54.6
45	なし	0	40.5	43.3	検出せず	16.2
		1	検出せず	45.5	検出せず	54.5
		3	検出せず	43.7	検出せず	56.3
		6	検出せず	41.7	検出せず	58.3
	あり	6	検出せず	44.3	検出せず	55.7
55	なし	0	42.2	43.3	検出せず	14.5
		1	検出せず	45.0	検出せず	55.0
		3	検出せず	42.7	検出せず	57.3
		6	検出せず	40.3	検出せず	59.7
	あり	6	検出せず	44.1	検出せず	55.9
65	なし	0	40.5	43.3	検出せず	16.2
		1	検出せず	44.7	検出せず	55.3
		3	検出せず	41.6	検出せず	58.4
		6	検出せず	37.3	検出せず	62.7
	あり	6	32.8	35.2	検出せず	32.0
80	なし	0	40.5	43.3	検出せず	16.2
		1	7.8	39.8	検出せず	52.4
		3	19.2	28.8	検出せず	52.0
		6	30.4	17.8	検出せず	51.7
	あり	6	60.9	17.4	検出せず	21.7

イソフラボングルコシドは、3群とも検討した全ての温度範囲で分解が起こり、37から65℃、特に55℃で速やかに起こる。さらに、脱脂大豆では、内在性のβ-グルコシダーゼも分解に関与している。その大部分がジグリコシダーゼによると考えられる修飾グルコシド配糖体の分解は、37から55℃で分解され易いことが示される。3群のアグリコンイソフラボンに共通して、55℃、6時間の反応でアグリコンの遊離が最大となった。きな粉ではグリシテインは約94%、ゲニステインは約74%、ダイゼインは約73%となった。豆乳では、グリシテインは約84%、ゲニス

テインは約80%、ダイゼインは約70%となった。濃縮大豆蛋白質ではグリシテインは約73%、ゲニステインは約61%、ダイゼインは約62%となった。脱脂大豆ではグリシテインは約57%、ゲニステインは約57%、ダイゼインは約60%となった。

これらの結果から、ジグリコシダーゼによる修飾グルコシド配糖体の分解は、37-65℃、特に55℃付近で効率よく起こることが示された。

実施例5（大豆素材を用いた、ジグリコシダーゼによるイソフラボンアグリコンへの転換におけるpHの検討）

各大豆素材（きな粉（富士食糧株式会社製）、豆乳（ギトー食品株式会社製）、脱脂大豆（不二製油株式会社製）、濃縮大豆タンパク質（不二製油株式会社製））50mgを精製水に懸濁しつつ、塩酸あるいは水酸化ナトリウムでpHを2から11に調製して、450μLの基質溶液を調製した。粗ジグリコシダーゼのジグリコシダーゼ活性を1.88AU/mLに調整したpH2-11の該酵素液50μLを添加し、全量500μL、55℃で反応を行った。反応0、1、3、6時間後の反応液にメタノールを700μL添加した。攪拌、超音波処理を施し、15,000rpm、4℃で10分間遠心分離した。上清をフィルターろ過して反応液中に含まれるイソフラボン配糖体およびアグリコンイソフラボンの存在をHPLCにより検出した（表15～26）。

表.15 きな粉におけるグリシチンファミリーの分解効率

反応 pH	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン グリシテイン
			グリシチン	マロニルグリシチン	アセチルグリシチン	
pH2	なし	0	56.8	検出せず	35.3	7.9
		1	56.6	検出せず	34.0	9.4
		3	56.3	検出せず	34.2	9.5
		6	54.4	検出せず	35.5	10.1
	あり	6	54.4	検出せず	35.2	10.4
pH3	なし	0	56.8	検出せず	35.3	7.9
		1	検出せず	検出せず	38.7	61.3
		3	検出せず	検出せず	30.8	69.2
		6	検出せず	検出せず	31.7	68.3
	あり	6	55.1	検出せず	35.6	9.3
pH4	なし	0	56.6	検出せず	34.8	8.6
		1	検出せず	検出せず	18.8	81.2
		3	検出せず	検出せず	8.2	91.8
		6	検出せず	検出せず	検出せず	100.0
	あり	6	55.1	検出せず	35.9	9.0
pH5	なし	0	56.6	検出せず	34.8	8.6
		1	検出せず	検出せず	22.9	77.1
		3	検出せず	検出せず	6.5	93.5
		6	検出せず	検出せず	検出せず	100.0
	あり	6	55.4	検出せず	35.2	9.4
pH6.5	なし	0	55.9	検出せず	35.4	8.8
		1	検出せず	検出せず	35.0	65.0
		3	検出せず	検出せず	19.7	80.3
		6	検出せず	検出せず	11.9	88.1
	あり	6	54.8	検出せず	35.4	9.8
pH8.5	なし	0	59.4	検出せず	31.0	9.6
		1	39.4	検出せず	32.4	28.2
		3	29.3	検出せず	30.6	40.1
		6	22.4	検出せず	30.2	47.4
	あり	6	59.2	検出せず	31.7	9.1

表16 きな粉におけるゲニステンファミリーの分解効率

反応 pH	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン ゲニステイン
			ゲニステン	マロニルゲニステン	アセチルゲニステン	
pH2	なし	0	50.0	検出せず	45.2	4.8
		1	49.7	検出せず	45.0	5.3
		3	50.7	検出せず	43.1	6.2
		6	52.7	検出せず	40.7	6.5
	あり	6	52.8	検出せず	41.2	6.0
pH3	なし	0	50.0	検出せず	45.2	4.8
		1	3.4	検出せず	45.2	51.4
		3	検出せず	検出せず	41.9	58.1
		6	検出せず	検出せず	43.5	56.5
	あり	6	49.9	検出せず	45.1	5.0
pH4	なし	0	49.9	検出せず	45.4	4.7
		1	検出せず	検出せず	36.3	63.7
		3	検出せず	検出せず	23.4	76.6
		6	検出せず	検出せず	13.4	86.6
	あり	6	50.2	検出せず	45.4	4.4
pH5	なし	0	49.9	検出せず	45.4	4.7
		1	検出せず	検出せず	39.9	60.1
		3	検出せず	検出せず	26.9	73.1
		6	検出せず	検出せず	17.6	82.4
	あり	6	52.6	検出せず	42.0	5.3
pH6.5	なし	0	49.4	検出せず	45.8	4.8
		1	検出せず	検出せず	45.3	54.7
		3	検出せず	検出せず	38.8	61.2
		6	検出せず	検出せず	34.0	66.0
	あり	6	54.8	検出せず	39.2	6.0
pH8.5	なし	0	55.8	検出せず	39.5	4.6
		1	28.7	検出せず	39.5	31.8
		3	19.2	検出せず	39.2	41.6
		6	14.5	検出せず	37.3	48.2
	あり	6	59.5	検出せず	35.2	5.3

表17. きな粉におけるダイズインファミリーの分解
効率

反応 pH	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン ダイゼイン
			ダイズイン	マロニルダイズイン	アセチルダイズイン	
pH2	なし	0	49.1	検出せず	47.4	3.5
		1	47.6	検出せず	46.9	5.4
		3	50.3	検出せず	45.0	4.8
		6	53.1	検出せず	42.4	4.5
	あり	6	53.8	検出せず	42.4	3.8
pH3	なし	0	49.1	検出せず	47.4	3.5
		1	検出せず	検出せず	46.0	54.0
		3	検出せず	検出せず	39.6	60.4
		6	検出せず	検出せず	40.7	59.3
	あり	6	49.0	検出せず	47.4	3.7
pH4	なし	0	48.7	検出せず	47.7	3.5
		1	検出せず	検出せず	34.4	65.6
		3	検出せず	検出せず	20.5	79.5
		6	検出せず	検出せず	11.1	88.9
	あり	6	48.6	検出せず	47.9	3.5
pH5	なし	0	48.7	検出せず	47.7	3.5
		1	検出せず	検出せず	38.5	61.5
		3	検出せず	検出せず	24.7	75.3
		6	検出せず	検出せず	15.2	84.8
	あり	6	50.6	検出せず	45.0	4.4
PH6.5	なし	0	48.4	検出せず	48.2	3.4
		1	検出せず	検出せず	45.4	54.6
		3	検出せず	検出せず	39.2	60.8
		6	検出せず	検出せず	34.4	65.6
	あり	6	51.9	検出せず	43.4	4.7
pH8.5	なし	0	54.1	検出せず	42.1	3.8
		1	20.4	検出せず	42.7	36.9
		3	13.3	検出せず	40.3	46.4
		6	10.2	検出せず	38.0	51.8
	あり	6	58.8	検出せず	37.3	3.9

表18. 豆乳におけるグリシチンファミリーの分解
効率

反応 pH	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン グリシテイン
			グリシチン	マロニルグリシチン	アセチルグリシチン	
pH2.3	なし	0	50.2	42.6	検出せず	7.2
		1	検出せず	51.3	検出せず	48.7
		3	検出せず	47.7	検出せず	52.3
		6	検出せず	46.5	検出せず	53.5
	あり	6	51.7	41.3	検出せず	6.9
pH3.5	なし	0	50.2	42.6	検出せず	7.2
		1	検出せず	21.9	検出せず	78.1
		3	検出せず	検出せず	検出せず	100.0
		6	検出せず	検出せず	検出せず	100.0
	あり	6	54.2	38.2	検出せず	7.6
pH4.8	なし	0	50.7	43.2	検出せず	6.2
		1	検出せず	37.0	検出せず	63.0
		3	検出せず	21.1	検出せず	78.9
		6	検出せず	8.3	検出せず	91.7
	あり	6	54.3	39.2	検出せず	6.5
pH6.2	なし	0	50.7	43.2	検出せず	6.2
		1	検出せず	46.4	検出せず	53.6
		3	検出せず	34.5	検出せず	65.5
		6	検出せず	29.6	検出せず	70.4
	あり	6	54.2	37.6	検出せず	8.2
pH7.2	なし	0	50.0	43.9	検出せず	6.1
		1	検出せず	48.8	検出せず	51.2
		3	検出せず	46.2	検出せず	53.8
		6	検出せず	41.6	検出せず	58.4
	あり	6	56.9	37.5	検出せず	5.6
pH11.6	なし	0	54.3	39.4	検出せず	6.2
		1	検出せず	50.4	検出せず	49.6
		3	検出せず	46.5	検出せず	53.5
		6	検出せず	44.0	検出せず	56.0
	あり	6	59.7	34.4	検出せず	5.8

表19. 豆乳におけるゲニスチンファミリーの分解効率

反応 pH	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン
			ゲニスチン	マロニルゲニスチン	アセチルゲニスチン	ゲニステイン
pH2.3	なし	0	31.5	58.2	0.6	9.8
		1	検出せず	57.5	0.7	41.8
		3	検出せず	54.1	0.8	45.1
		6	検出せず	52.1	0.6	47.3
	あり	6	35.5	54.3	0.6	9.6
pH3.5	なし	0	31.5	58.2	0.6	9.8
		1	検出せず	27.9	検出せず	72.1
		3	検出せず	7.5	検出せず	92.5
		6	検出せず	2.7	検出せず	97.3
	あり	6	37.0	52.7	0.5	9.8
pH4.8	なし	0	31.7	58.6	0.5	9.1
		1	検出せず	41.0	検出せず	59.0
		3	検出せず	23.9	検出せず	76.1
		6	検出せず	11.3	検出せず	88.7
	あり	6	37.8	51.9	0.6	9.7
pH6.2	なし	0	31.7	58.6	0.5	9.1
		1	検出せず	52.6	検出せず	47.4
		3	検出せず	41.2	検出せず	58.8
		6	検出せず	35.8	検出せず	64.2
	あり	6	38.3	51.5	0.6	9.5
pH7.2	なし	0	31.2	57.0	0.7	11.1
		1	検出せず	56.9	検出せず	43.1
		3	検出せず	51.5	検出せず	48.5
		6	検出せず	46.4	検出せず	53.6
	あり	6	38.9	51.1	0.7	9.3
pH11.6	なし	0	34.8	54.2	0.5	10.5
		1	検出せず	57.7	検出せず	42.3
		3	検出せず	52.6	検出せず	47.4
		6	検出せず	49.5	検出せず	50.5
	あり	6	41.3	47.7	0.9	10.1

表20. 豆乳におけるダイズインファミリーの分解
効率

反応 pH	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン ダイゼイン
			ダイズイン	マロニルダイズイン	アセチルダイズイン	
pH2.3	なし	0	34.4	55.1	検出せず	10.5
		1	検出せず	54.7	検出せず	45.3
		3	検出せず	51.1	検出せず	48.9
		6	検出せず	48.5	検出せず	51.5
	あり	6	38.8	51.0	検出せず	10.2
pH3.5	なし	0	34.4	55.1	検出せず	10.5
		1	検出せず	35.6	検出せず	64.4
		3	検出せず	15.1	検出せず	84.9
		6	検出せず	7.4	検出せず	92.6
	あり	6	40.4	49.1	検出せず	10.6
pH4.8	なし	0	34.9	56.2	検出せず	9.0
		1	検出せず	47.4	検出せず	52.6
		3	検出せず	33.9	検出せず	66.1
		6	検出せず	20.3	検出せず	79.7
	あり	6	41.2	49.7	検出せず	9.1
pH6.2	なし	0	34.9	56.2	検出せず	9.0
		1	検出せず	54.1	検出せず	45.9
		3	検出せず	46.4	検出せず	53.6
		6	検出せず	41.9	検出せず	58.1
	あり	6	40.6	49.7	検出せず	9.7
pH7.2	なし	0	34.9	56.1	検出せず	9.0
		1	検出せず	56.4	検出せず	43.6
		3	検出せず	52.4	検出せず	47.6
		6	検出せず	48.2	検出せず	51.8
	あり	6	41.5	48.3	検出せず	10.2
pH11.6	なし	0	38.8	52.5	検出せず	8.7
		1	検出せず	56.4	検出せず	43.6
		3	検出せず	50.4	検出せず	49.6
		6	検出せず	47.7	検出せず	52.3
	あり	6	44.6	46.1	検出せず	9.3

表21. 濃縮大豆蛋白質におけるグリシチンファミリーの分解
効率

反応 pH	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン グリシチン
			グリシチン	マロニルグリシチン	アセチルグリシチン	
pH1.6	なし	0	52.3	0.4	35.9	11.3
		1	52.9	0.4	35.1	11.6
		3	54.3	0.4	33.5	11.7
		6	56.1	0.4	31.8	11.7
	あり	6	57.9	0.4	30.9	10.8
pH2.7	なし	0	52.3	0.4	35.9	11.3
		1	38.0	0.5	36.6	25.0
		3	37.2	0.5	36.5	25.7
		6	33.7	0.5	36.6	29.2
	あり	6	52.7	0.4	35.4	11.5
pH3.7	なし	0	52.4	0.4	36.1	11.1
		1	検出せず	0.5	32.9	66.7
		3	検出せず	0.4	26.1	73.5
		6	検出せず	0.4	22.1	77.5
	あり	6	52.4	0.4	35.9	11.3
pH5.1	なし	0	52.4	0.4	36.1	11.1
		1	4.1	0.6	33.2	62.1
		3	検出せず	0.6	26.0	73.4
		6	検出せず	0.6	21.0	78.5
	あり	6	52.3	0.4	35.8	11.5
pH6.6	なし	0	52.2	0.4	36.1	11.3
		1	22.6	0.4	34.8	42.2
		3	6.9	0.4	32.4	60.3
		6	2.0	0.4	29.5	68.1
	あり	6	53.3	0.4	35.2	11.1
pH8.6	なし	0	54.9	0.4	33.0	11.7
		1	51.6	0.4	32.6	15.4
		3	45.9	0.4	32.6	21.0
		6	36.7	0.4	32.0	30.9
	あり	6	56.8	0.3	31.6	11.3

表.22 濃縮大豆蛋白質におけるゲニスチンファミリーの分解効率

反応 pH	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン ゲニステイン
			ゲニスチン	マロニルゲニスチン	アセチルゲニスチン	
pH1.6	なし	0	49.7	検出せず	42.5	7.8
		1	50.2	検出せず	42.2	7.6
		3	51.6	検出せず	40.6	7.8
		6	53.3	検出せず	38.9	7.9
		あり 6	54.4	検出せず	37.7	7.9
	あり 6	6	54.4	検出せず	37.7	7.9
pH2.7	なし	0	49.7	検出せず	42.5	7.8
		1	23.1	検出せず	44.3	32.6
		3	22.1	検出せず	43.7	34.2
		6	17.5	検出せず	44.0	38.4
		あり 6	50.5	検出せず	42.5	7.0
	あり 6	6	50.5	検出せず	42.5	7.0
pH3.7	なし	0	50.7	検出せず	43.1	6.2
		1	検出せず	検出せず	43.5	56.5
		3	検出せず	検出せず	36.9	63.1
		6	検出せず	検出せず	30.7	69.3
		あり 6	50.6	検出せず	43.0	6.4
	あり 6	6	50.6	検出せず	43.0	6.4
pH5.1	なし	0	50.7	検出せず	43.1	6.2
		1	検出せず	検出せず	45.2	54.8
		3	検出せず	検出せず	40.2	59.8
		6	検出せず	検出せず	35.6	64.4
		あり 6	51.4	検出せず	42.4	6.2
	あり 6	6	51.4	検出せず	42.4	6.2
pH6.6	なし	0	50.4	検出せず	43.0	6.5
		1	13.9	検出せず	43.6	42.4
		3	3.8	検出せず	42.8	53.3
		6	1.7	検出せず	41.0	57.2
		あり 6	53.2	検出せず	40.6	6.2
	あり 6	6	53.2	検出せず	40.6	6.2
pH8.6	なし	0	53.8	検出せず	39.7	6.5
		1	50.4	検出せず	38.8	10.8
		3	45.1	検出せず	39.0	15.8
		6	36.3	検出せず	38.5	25.2
		あり 6	56.2	検出せず	37.6	6.2
	あり 6	6	56.2	検出せず	37.6	6.2

表23. 濃縮大豆蛋白質におけるダイズインファミリーの分解
効率

反応 pH	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン ダイゼイン
			ダイズイン	マロニルダイズイン	アセチルダイズイン	
pH1.6	なし	0	52.5	検出せず	44.5	3.0
		1	53.0	検出せず	43.7	3.3
		3	55.0	検出せず	41.7	3.3
		6	57.2	検出せず	39.4	3.4
	あり	6	59.0	検出せず	38.1	2.9
pH2.7	なし	0	52.5	検出せず	44.5	3.0
		1	12.9	検出せず	46.4	40.7
		3	12.5	検出せず	46.0	41.6
		6	9.3	検出せず	45.8	45.0
	あり	6	53.0	検出せず	43.9	3.2
pH3.7	なし	0	52.5	検出せず	44.6	3.0
		1	検出せず	検出せず	41.6	58.4
		3	検出せず	検出せず	33.0	67.0
		6	検出せず	検出せず	25.2	74.8
	あり	6	52.5	検出せず	44.4	3.1
pH5.1	なし	0	52.5	検出せず	44.6	3.0
		1	検出せず	検出せず	43.4	56.6
		3	検出せず	検出せず	37.0	63.0
		6	検出せず	検出せず	31.2	68.8
	あり	6	53.4	検出せず	43.4	3.2
pH6.6	なし	0	52.1	検出せず	44.8	3.0
		1	5.0	検出せず	43.9	51.0
		3	検出せず	検出せず	42.9	57.1
		6	検出せず	検出せず	41.2	58.8
	あり	6	55.1	検出せず	41.8	3.2
pH8.6	なし	0	56.1	検出せず	40.7	3.2
		1	50.8	検出せず	39.2	9.9
		3	45.0	検出せず	39.0	15.9
		6	34.5	検出せず	38.1	27.4
	あり	6	59.1	検出せず	37.7	3.2

表24. 脱脂大豆におけるグリシチンファミリー
の分解効率

反応 pH	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン グリシチン
			グリシチン	マロニルグリシチン	アセチルグリシチン	
pH2.6	なし	0	検出せず	100.0	検出せず	検出せず
		1	検出せず	100.0	検出せず	検出せず
		3	検出せず	100.0	検出せず	検出せず
		6	検出せず	100.0	検出せず	検出せず
	あり	6	検出せず	100.0	検出せず	検出せず
pH3.4	なし	0	検出せず	100.0	検出せず	検出せず
		1	検出せず	100.0	検出せず	検出せず
		3	検出せず	100.0	検出せず	検出せず
		6	検出せず	100.0	検出せず	検出せず
	あり	6	検出せず	100.0	検出せず	検出せず
pH4.8	なし	0	検出せず	64.0	検出せず	36.0
		1	検出せず	40.1	検出せず	59.9
		3	検出せず	37.5	検出せず	62.5
		6	検出せず	31.9	検出せず	68.1
	あり	6	検出せず	56.2	検出せず	43.8
pH5.4	なし	0	検出せず	64.0	検出せず	36.0
		1	検出せず	45.1	検出せず	54.9
		3	検出せず	100.0	検出せず	検出せず
		6	検出せず	32.3	検出せず	67.7
	あり	6	検出せず	39.3	検出せず	60.7
pH6.6	なし	0	検出せず	39.6	検出せず	60.4
		1	検出せず	52.9	検出せず	47.1
		3	検出せず	53.6	検出せず	46.4
		6	検出せず	58.1	検出せず	41.9
	あり	6	検出せず	50.3	検出せず	49.7
pH7.8	なし	0	検出せず	66.8	検出せず	33.2
		1	検出せず	57.5	検出せず	42.5
		3	検出せず	53.2	検出せず	46.8
		6	検出せず	49.1	検出せず	50.9
	あり	6	検出せず	55.8	検出せず	44.2

表25. 脱脂大豆におけるゲニスチンファミリーの
分解効率

反応 pH	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン ゲニステイン
			ゲニスチン	マロニルゲニスチン	アセチルゲニスチン	
pH2.6	なし	0	42.0	43.8	1.8	12.4
		1	36.3	44.4	1.7	17.7
		3	20.3	45.4	1.7	32.7
		6	20.1	43.5	1.9	34.6
	あり	6	44.3	42.0	1.6	12.1
pH3.4	なし	0	42.0	43.8	1.8	12.4
		1	検出せず	41.6	1.5	56.9
		3	検出せず	36.4	1.1	62.5
		6	検出せず	30.4	0.8	68.8
	あり	6	44.3	39.8	1.8	14.1
pH4.8	なし	0	40.5	43.2	1.8	14.5
		1	検出せず	42.8	1.0	56.1
		3	検出せず	37.5	0.6	61.9
		6	検出せず	31.1	0.4	68.5
	あり	6	31.8	41.7	1.3	25.2
pH5.4	なし	0	40.5	43.2	1.8	14.5
		1	検出せず	48.0	0.5	51.5
		3	検出せず	44.6	検出せず	55.4
		6	検出せず	39.7	検出せず	60.3
	あり	6	6.2	45.8	検出せず	48.0
pH6.6	なし	0	39.2	47.1	1.7	12.0
		1	検出せず	50.1	0.6	49.3
		3	検出せず	48.3	0.3	51.4
		6	検出せず	46.1	0.2	53.7
	あり	6	7.7	45.7	0.2	46.4
pH7.8	なし	0	40.4	45.8	1.6	12.2
		1	15.7	46.6	1.0	36.7
		3	12.3	44.4	0.8	42.5
		6	11.4	42.2	0.7	45.7
	あり	6	37.5	39.9	0.6	22.0

表26. 脱脂大豆におけるダイズインファミリーの
分解効率

反応 pH	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン ダイゼイン
			ダイズイン	マロニルダイズイン	アセチルダイズイン	
pH2.6	なし	0	45.8	41.0	検出せず	13.2
		1	37.5	41.2	検出せず	21.3
		3	17.3	41.8	検出せず	40.9
		6	16.9	40.2	検出せず	42.9
	あり	6	48.0	38.9	検出せず	13.0
pH3.4	なし	0	45.8	41.0	検出せず	13.2
		1	検出せず	39.4	検出せず	60.6
		3	検出せず	34.5	検出せず	65.5
		6	検出せず	29.0	検出せず	71.0
	あり	6	47.8	37.1	検出せず	15.1
pH4.8	なし	0	43.5	40.7	検出せず	15.7
		1	検出せず	40.5	検出せず	59.5
		3	検出せず	36.7	検出せず	63.3
		6	検出せず	30.5	検出せず	69.5
	あり	6	37.1	38.4	検出せず	24.5
pH5.4	なし	0	43.5	40.7	検出せず	15.7
		1	検出せず	44.2	検出せず	55.8
		3	検出せず	41.5	検出せず	58.5
		6	検出せず	36.9	検出せず	63.1
	あり	6	検出せず	44.9	検出せず	55.1
pH6.6	なし	0	43.6	43.1	検出せず	13.2
		1	検出せず	45.9	検出せず	54.1
		3	検出せず	44.0	検出せず	56.0
		6	検出せず	41.8	検出せず	58.2
	あり	6	9.3	41.2	検出せず	49.5
pH7.8	なし	0	44.7	42.0	検出せず	13.3
		1	13.3	43.6	検出せず	43.1
		3	10.1	41.4	検出せず	48.4
		6	9.4	38.7	検出せず	51.9
	あり	6	41.6	36.7	検出せず	21.7

これらの結果から、至適pHは3.5から5の範囲にあることがわかった。具体的には、きな粉ではpH4、反応6時間で各イソフラボンファミリーのアグリコンの存在率は、グリシテイン100%、ゲニステイン87%、ダイゼイン89%となった。豆乳においては、pH3.5、6時間の反応でイソフラボン配糖体のほぼ完全な分解

が起こり、グリシテイン100%、ゲニステイン97%、ダイゼイン93%である。濃縮大豆タンパク質では、pH3.7、反応6時間でグリシテイン78%、ゲニステイン69%、ダイゼイン75%である。脱脂大豆では、pH3.4、反応6時間でアグリコンの最大遊離が見られ、グリシテイン68%、ゲニステイン69%、ダイゼイン71%である。

実施例6（大豆素材を用いた、ジグリコシダーゼによるイソフラボンアグリコンへの転換における基質濃度の検討）

各大豆素材（きな粉（富士食糧株式会社製）、豆乳（ギトー食品株式会社製）、脱脂大豆（不二製油株式会社製）、濃縮大豆タンパク質（不二製油株式会社製））0.1g、0.25g、0.5g、1.0g、1.5gをpH4.0の20mM酢酸緩衝液に懸濁した。懸濁液のpHを測定し、1N塩酸溶液でpHを4.0に調整しつつ液量を4.5mLに調整した。粗ジグリコシダーゼのジグリコシダーゼ活性を1.88AU/mLに調整した酵素剤を0.5mL添加し、最終液量を5.0mLとした。即ち、反応液中に占める大豆素材の割合は、2%、5%、10%、20%、30%（w/v）となる。55℃で振とうしながら反応させた。反応後0、1、3、6時間における反応液5mLに対してエタノールを7mL添加し、超音波処理を施した後、良くかき混ぜた。2,000rpm、室温で5分間遠心分離し、さらにその上清1mLを1.5mL容のマイクロチューブに移し、15,000rpm、4℃で10分間遠心分離を行った。上清をフィルターろ過し、各サンプルの基質濃度に応じて1～6倍に適宜希釈した。希釈液の50μLをHPLCで分析した（表27～38）。

表.27 きな粉におけるグリシチンファミリー
の分解効率

基質濃度 (%)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン グリシチン
			グリシチン	マロニルグリシチン	アセチル グリシチン	
2	なし	0	50.2	検出せず	33.6	16.2
		1	検出せず	検出せず	検出せず	100.0
		3	検出せず	検出せず	検出せず	100.0
		6	検出せず	検出せず	検出せず	100.0
	あり	6	53.4	検出せず	34.4	12.2
5	なし	0	54.8	検出せず	33.8	11.4
		1	検出せず	検出せず	11.8	88.2
		3	検出せず	検出せず	7.2	92.8
		6	検出せず	検出せず	検出せず	100.0
	あり	6	54.8	検出せず	33.8	11.4
10	なし	0	70.3	検出せず	24.2	5.5
		1	検出せず	検出せず	16.7	83.3
		3	検出せず	検出せず	9.7	90.3
		6	検出せず	検出せず	検出せず	100.0
	あり	6	55.0	検出せず	35.1	9.9
20	なし	0	59.6	検出せず	31.8	8.6
		1	検出せず	検出せず	22.9	77.1
		3	検出せず	検出せず	13.8	86.2
		6	検出せず	検出せず	10.0	90.0
	あり	6	56.0	検出せず	35.0	9.1
30	なし	0	55.9	検出せず	35.3	8.8
		1	検出せず	検出せず	28.4	71.6
		3	検出せず	検出せず	24.4	75.6
		6	検出せず	検出せず	13.7	86.3
	あり	6	56.9	検出せず	34.4	8.7

表28. きな粉におけるゲニスチンファミリーの
分解効率

基質濃度 (%)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン
			ゲニスチン	マロニルゲニスチン	アセチルゲ ニスチン	ゲニステイン
2	なし	0	33.2	検出せず	44.7	22.1
		1	検出せず	検出せず	10.6	89.4
		3	検出せず	検出せず	5.0	95.0
		6	検出せず	検出せず	1.5	98.5
	あり	6	48.4	検出せず	45.0	6.7
5	なし	0	47.8	検出せず	44.7	7.5
		1	検出せず	検出せず	22.1	77.9
		3	検出せず	検出せず	15.2	84.8
		6	検出せず	検出せず	9.2	90.8
	あり	6	47.8	検出せず	44.7	7.5
10	なし	0	59.5	検出せず	38.2	2.3
		1	検出せず	検出せず	33.3	66.7
		3	検出せず	検出せず	25.3	74.7
		6	検出せず	検出せず	18.7	81.3
	あり	6	49.5	検出せず	45.9	4.6
20	なし	0	50.5	検出せず	46.1	3.4
		1	検出せず	検出せず	44.1	55.9
		3	検出せず	検出せず	35.8	64.2
		6	検出せず	検出せず	28.6	71.4
	あり	6	49.5	検出せず	46.2	4.3
30	なし	0	49.4	検出せず	46.7	3.8
		1	5.7	検出せず	46.6	47.7
		3	9.6	検出せず	41.4	48.9
		6	2.0	検出せず	37.8	60.2
	あり	6	50.1	検出せず	46.1	3.8

表29. きな粉におけるダイズインファミリーの分解効率

基質濃度 (%)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン ダイゼイン
			ダイズイン	マロニルダイズイン	アセチルダイズイン	
2	なし	0	30.2	検出せず	47.6	22.3
		1	検出せず	検出せず	9.2	90.8
		3	検出せず	検出せず	検出せず	100.0
		6	検出せず	検出せず	検出せず	100.0
	あり	6	46.6	検出せず	47.2	6.2
5	なし	0	46.1	検出せず	46.1	7.7
		1	検出せず	検出せず	20.9	79.1
		3	検出せず	検出せず	12.5	87.5
		6	検出せず	検出せず	6.8	93.2
	あり	6	46.1	検出せず	46.1	7.7
10	なし	0	60.1	検出せず	38.5	1.4
		1	検出せず	検出せず	30.5	69.5
		3	検出せず	検出せず	21.5	78.5
		6	検出せず	検出せず	14.9	85.1
	あり	6	47.5	検出せず	47.7	4.8
20	なし	0	50.3	検出せず	46.1	3.7
		1	検出せず	検出せず	40.7	59.3
		3	検出せず	検出せず	32.6	67.4
		6	検出せず	検出せず	25.1	74.9
	あり	6	48.6	検出せず	47.2	4.2
30	なし	0	47.7	検出せず	47.6	4.7
		1	検出せず	検出せず	46.4	53.6
		3	検出せず	検出せず	42.6	57.4
		6	検出せず	検出せず	34.3	65.7
	あり	6	49.0	検出せず	47.4	3.6

表30. 豆乳におけるグリシチンファミリーの分解効率

基質濃度 (%)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン
			グリシチン	マロニルグリシチン	アセチル グリシチン	グリシテイン
2	なし	0	71.8	28.2	検出せず	検出せず
		1	検出せず	検出せず	検出せず	100.0
		3	検出せず	検出せず	検出せず	100.0
		6	検出せず	検出せず	検出せず	100.0
	あり	6	51.8	48.2	検出せず	検出せず
5	なし	0	49.4	50.6	検出せず	検出せず
		1	検出せず	24.6	検出せず	75.4
		3	検出せず	7.5	検出せず	92.5
		6	検出せず	検出せず	検出せず	100.0
	あり	6	56.7	43.3	検出せず	検出せず
10	なし	0	52.5	41.1	検出せず	6.4
		1	検出せず	26.4	検出せず	73.6
		3	検出せず	10.5	検出せず	89.5
		6	検出せず	4.2	検出せず	95.8
	あり	6	56.8	37.0	検出せず	6.2
20	なし	0	52.4	41.3	検出せず	6.3
		1	検出せず	27.8	検出せず	72.2
		3	検出せず	9.4	検出せず	90.6
		6	検出せず	5.9	検出せず	94.1
	あり	6	55.5	38.8	検出せず	5.7
30	なし	0	50.9	43.0	検出せず	6.1
		1	検出せず	33.1	検出せず	66.9
		3	検出せず	15.9	検出せず	84.1
		6	検出せず	7.7	検出せず	92.3
	あり	6	55.8	37.5	検出せず	6.7

表31. 豆乳におけるゲニスチン
ファミリーの分解効率

基質濃度 (%)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン ゲニステイン
			ゲニスチン	マロニルゲニスチン	アセチル ゲニスチ ン	
2	なし	0	54.5	35.0	検出せず	10.5
		1	検出せず	15.3	検出せず	84.7
		3	検出せず	3.5	検出せず	96.5
		6	検出せず	0.0	検出せず	100.0
	あり	6	38.0	49.5	検出せず	12.5
5	なし	0	31.5	58.2	検出せず	10.3
		1	検出せず	24.9	検出せず	75.1
		3	検出せず	6.9	検出せず	93.1
		6	検出せず	2.1	検出せず	97.9
	あり	6	37.9	52.5	検出せず	9.7
10	なし	0	32.9	56.5	0.5	10.1
		1	検出せず	31.5	検出せず	68.5
		3	検出せず	11.9	検出せず	88.1
		6	検出せず	4.8	検出せず	95.2
	あり	6	37.6	51.2	0.5	10.6
20	なし	0	33.3	56.3	0.6	9.9
		1	検出せず	37.6	検出せず	62.4
		3	検出せず	15.7	検出せず	84.3
		6	検出せず	10.7	検出せず	89.3
	あり	6	38.6	51.0	0.6	9.8
30	なし	0	33.6	55.9	0.6	9.9
		1	検出せず	42.5	検出せず	57.5
		3	検出せず	25.4	検出せず	74.6
		6	検出せず	17.1	検出せず	82.9
	あり	6	38.6	50.0	0.6	10.9

表32. 豆乳におけるダイズイン
ファミリーの分解効率

基質温度 (%)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン ダイゼイン
			ダイズイン	マロニルダイズイン	アセチル ダイズイ ン	
2	なし	0	53.5	32.2	検出せず	14.4
		1	検出せず	27.5	検出せず	72.5
		3	検出せず	9.9	検出せず	90.1
		6	検出せず	2.9	検出せず	97.1
	あり	6	39.8	47.0	検出せず	13.1
5	なし	0	34.2	53.6	検出せず	12.2
		1	検出せず	34.2	検出せず	65.8
		3	検出せず	15.9	検出せず	84.1
		6	検出せず	6.1	検出せず	93.9
	あり	6	40.5	47.6	検出せず	12.0
10	なし	0	34.6	53.4	検出せず	12.0
		1	検出せず	37.4	検出せず	62.6
		3	検出せず	20.5	検出せず	79.5
		6	検出せず	10.7	検出せず	89.3
	あり	6	39.4	47.8	検出せず	12.8
20	なし	0	34.1	53.6	検出せず	12.3
		1	検出せず	41.2	検出せず	58.8
		3	検出せず	21.5	検出せず	78.5
		6	検出せず	16.4	検出せず	83.6
	あり	6	39.8	48.1	検出せず	12.1
30	なし	0	34.9	53.5	検出せず	11.6
		1	検出せず	43.8	検出せず	56.2
		3	検出せず	29.7	検出せず	70.3
		6	検出せず	21.9	検出せず	78.1
	あり	6	40.0	46.9	検出せず	13.1

表33. 濃縮大豆蛋白質における
グリシチンファミリーの分解効
率

基質濃度 (%)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン グリシチン
			グリシチン	マロニルグリシチン	アセチル グリシチン	
2	なし	0	52.2	0.4	35.8	11.6
		1	検出せず	0.4	14.3	85.3
		3	検出せず	0.2	5.3	94.4
		6	検出せず	検出せず	0.0	100.0
	あり	6	53.4	0.4	35.0	11.2
5	なし	0	52.9	0.4	35.6	11.2
		1	検出せず	0.5	27.1	72.4
		3	検出せず	0.4	17.8	81.9
		6	検出せず	0.2	12.3	87.4
	あり	6	54.0	0.4	34.4	11.3
10	なし	0	52.9	0.3	35.7	11.0
		1	1.6	0.4	31.2	66.8
		3	検出せず	0.3	26.2	73.5
		6	検出せず	0.3	23.9	75.8
	あり	6	53.4	0.3	35.2	11.1
20	なし	0	53.1	0.2	35.9	10.8
		1	13.2	0.3	35.4	51.2
		3	検出せず	0.2	33.6	66.2
		6	検出せず	0.3	30.5	69.2
	あり	6	52.8	0.4	35.8	11.1
30	なし	0	57.5	0.4	33.9	8.2
		1	2.0	0.6	35.9	61.5
		3	検出せず	0.5	30.7	68.9
		6	検出せず	0.3	28.3	71.4
	あり	6	58.0	0.4	33.4	8.2

表34. 濃縮大豆蛋白質における
ゲニステンファミリーの分解効
率

基質濃度 (%)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン
			ゲニステン	マロニルゲニステン	アセチル ゲニステ ン	ゲニステイン
2	なし	0	50.5	検出せず	42.9	6.6
		1	1.2	検出せず	20.0	78.7
		3	検出せず	検出せず	8.3	91.7
		6	検出せず	検出せず	3.3	96.7
	あり	6	51.6	検出せず	41.3	7.0
5	なし	0	51.2	検出せず	43.1	5.8
		1	検出せず	検出せず	36.4	63.6
		3	検出せず	検出せず	26.3	73.7
		6	検出せず	検出せず	17.8	82.2
	あり	6	52.2	検出せず	41.7	6.2
10	なし	0	50.6	検出せず	43.4	5.9
		1	1.3	検出せず	42.8	55.8
		3	検出せず	検出せず	37.3	62.7
		6	検出せず	検出せず	33.2	66.8
	あり	6	50.9	検出せず	42.8	6.3
20	なし	0	50.4	検出せず	43.7	5.9
		1	6.0	検出せず	47.0	46.9
		3	検出せず	検出せず	44.6	55.4
		6	検出せず	検出せず	42.3	57.7
	あり	6	50.8	検出せず	43.2	6.1
30	なし	0	54.6	検出せず	43.5	1.9
		1	2.8	検出せず	65.3	31.9
		3	検出せず	検出せず	61.0	39.0
		6	検出せず	検出せず	55.9	44.1
	あり	6	55.6	検出せず	42.4	2.0

表35. 濃縮大豆蛋白質における
ダイズインファミリーの分解効
率

基質濃度 (%)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン ダイゼイン
			ダイズイン	マロニルダイズイン	アセチル ダイズイ ン	
2	なし	0	52.8	検出せず	44.0	3.2
		1	検出せず	検出せず	17.8	82.2
		3	検出せず	検出せず	5.3	94.7
		6	検出せず	検出せず	検出せず	100.0
	あり	6	52.6	検出せず	43.2	4.2
5	なし	0	53.0	検出せず	44.0	3.1
		1	検出せず	検出せず	32.6	67.4
		3	検出せず	検出せず	20.5	79.5
		6	検出せず	検出せず	12.0	88.0
	あり	6	53.5	検出せず	43.0	3.5
10	なし	0	52.8	検出せず	44.2	3.0
		1	2.2	検出せず	39.7	58.1
		3	検出せず	検出せず	32.9	67.1
		6	検出せず	検出せず	26.9	73.1
	あり	6	53.3	検出せず	43.4	3.3
20	なし	0	52.9	検出せず	44.1	3.0
		1	0.7	検出せず	46.4	52.9
		3	検出せず	検出せず	41.5	58.5
		6	検出せず	検出せず	37.9	62.1
	あり	6	52.8	検出せず	44.0	3.2
30	なし	0	49.2	検出せず	49.2	1.7
		1	2.7	検出せず	56.6	40.7
		3	検出せず	検出せず	49.9	50.1
		6	検出せず	検出せず	42.8	57.2
	あり	6	49.8	検出せず	48.4	1.8

表36 脱脂大豆におけるグリシチンファミリーの分解効率

基質濃度 (%)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン グリシテイン
			グリシチン	マロニルグリシチン	アセチル グリシチン	
2	なし	0	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず
		1	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず
		3	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず
		6	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず
	あり	6	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず
5	なし	0	検出せず	58.4	検出せず	41.6
		1	検出せず	41.6	検出せず	58.4
		3	検出せず	31.8	検出せず	68.2
		6	検出せず	19.5	検出せず	80.5
	あり	6	検出せず	58.5	検出せず	41.5
10	なし	0	検出せず	53.0	検出せず	47.0
		1	検出せず	54.7	検出せず	45.3
		3	検出せず	36.6	検出せず	63.4
		6	検出せず	27.9	検出せず	72.1
	あり	6	検出せず	57.6	検出せず	42.4

表.37 脱脂大豆におけるゲニスチンファミリーの分解効率

基質濃度 (%)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン ゲニステイン
			ゲニスチン	マロニルゲニスチン	アセチル ゲニスチン	
2	なし	0	37.7	45.4	1.8	15.1
		1	検出せず	31.4	検出せず	68.6
		3	検出せず	17.0	検出せず	83.0
		6	検出せず	11.4	検出せず	88.6
	あり	6	38.7	41.8	1.5	18.0
5	なし	0	40.0	43.9	1.9	14.2
		1	検出せず	38.0	0.8	61.2
		3	検出せず	29.6	0.5	69.9
		6	検出せず	19.0	0.3	80.7
	あり	6	41.8	41.1	1.8	15.4
10	なし	0	42.4	41.6	1.9	14.1
		1	検出せず	41.5	1.3	57.2
		3	検出せず	35.1	0.9	64.0
		6	検出せず	29.1	0.6	70.3
	あり	6	44.3	39.4	1.7	14.5

表38. 脱脂大豆におけるダイズインファミリーの分解効率

基質濃度 (%)	酵素の 熱処理	反応時間 (h)	配糖体			アグリコン ダイゼイン
			ダイズイン	マロニルダイズイン	アセチル ダイズイン	
2	なし	0	42.3	42.2	検出せず	15.5
		1	検出せず	35.2	検出せず	64.8
		3	検出せず	21.2	検出せず	78.8
		6	検出せず	16.5	検出せず	83.5
	あり	6	43.7	38.1	検出せず	18.2
5	なし	0	44.0	41.1	検出せず	14.9
		1	検出せず	37.7	検出せず	62.3
		3	検出せず	30.6	検出せず	69.4
		6	検出せず	21.0	検出せず	79.0
	あり	6	45.8	38.1	検出せず	16.1
10	なし	0	45.6	39.7	検出せず	14.7
		1	検出せず	39.5	検出せず	60.5
		3	検出せず	34.2	検出せず	65.8
		6	検出せず	29.0	検出せず	71.0
	あり	6	47.5	37.0	検出せず	15.5

至適反応温度、pHを組み合わせるにより、検討した全ての素材において、10%以下の素材濃度であれば各イソフラボン配糖体のアグリコンの遊離は70%以上となった。特に素材濃度が2%ないし5%であるときには、ほぼ100%のイソフラボン配糖体からアグリコンへの転換が起こることが示された。

実施例7 (ジグリコシダーゼによるアグリコンイソフラボンへの転換反応を促進させる市販酵素剤の影響)

ソヤフラボン (Soyaflavone、不二製油株式会社製) を pH 3.0 の 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液に懸濁し、該基質濃度を 30% (w/v)、溶液 pH を 5.0 となるように調製した。50℃で1時間ブレインキュベーションして、懸濁液の温度を 50℃に上昇させた。この懸濁液に各市販酵素剤 (アミラーゼ AD「アマノ」1、YL-15、グルクザイム NL 4.2、トランスグルコシダーゼ L「アマノ」、全て天野エンザイム株式会社製) を単独あるいはジグリコシダーゼ (0.3 AU) と組み合わせて 0.1% (w/v) となるように添加した。

50℃で6時間反応させ、イソフラボン配糖体及びアグリコンイソフラボン組成の変化をHPLCで分析した。イソフラボン配糖体及びアグリコンイソフラボンを定量し、そのうちのアグリコンイソフラボン理想値を100%とした場合の相対値を図1に示した。

各アグリコンイソフラボンの理想値は、酵素無添加のイソフラボン配糖体及びアグリコンイソフラボンの含量から各アグリコンイソフラボンごとに以下のように算出した。

アグリコンイソフラボンの理想値

$$= AG + G_1 \times M_{AG} / M_{G_1} + G_2 \times M_{AG} / M_{G_2} + \dots$$

AG; アグリコンイソフラボン量、G₁; イソフラボン配糖体の量、M_{AG}; アグリコンイソフラボンの分子量、M_G; イソフラボン配糖体の分子量

各市販酵素剤は、それ自体では配糖体をほとんど加水分解する事が出来ないが、ジグリコシダーゼと組み合わせる事によって、遊離アグリコンイソフラボンの量を明らかに増加させた。例えば、ジグリコシダーゼとアミラーゼAD「アマノ」1を組み合わせる事により、ジグリコシダーゼ単独の作用に比べて、グリシテインは2.1倍、ゲニステインは1.3倍の増加が認められた。しかしながら、ダイゼインは1.1倍程度の増加であった。ジグリコシダーゼとYL-15を組み合わせることにより、グリシテインは1.8倍、ゲニステインは1.2倍、ダイゼインは1.1倍、ジグリコシダーゼとグルクザイムNL-4.2を組み合わせることにより、グリシテインは0.8倍、ゲニステインは1.1倍、ダイゼインは1.0倍、ジグリコシダーゼとトランスグルコシダーゼL「アマノ」を組み合わせることにより、グリシテインは1.6倍、ゲニステインは1.0倍、ダイゼインは1.0倍の増加を示した。

実施例 8 (ジグリコシダーゼによるアグリコンイソフラボンへの転換反応を促進させるアミラーゼAD「アマノ」1の有効量の検討)

きな粉(富士食品株式会社製)をpH 3.15に調製した0.1M酢酸ナトリウム緩衝液に懸濁し、該基質濃度を30%(w/v)、溶液pHを5.0となるように調製した。50℃で1時間ブレインキュベーションして、懸濁液の温度を50℃に上昇させた。この懸濁液にジグリコシダーゼを最終濃度で0.1%(w/v)(0.3AU)、アミラーゼAD「アマノ」1(アマノエンザイム株式会社製)を0.1、0.05、0.01、0.005、0.0001%(w/v)となるように添加し50℃で3時間反応させ、イソフラボン組成の変化をHPLCで分析した。

図2に示すように、0.1%(w/v)よりも低い濃度の方がむしろアグリコンの遊離量が増加している事がわかる。0.0001%(w/v)という少量でも効果を示した。0.005%(w/v)で、グリシテインとゲニステインがそれぞれ1.23、1.20倍増加した。ダイゼインでは1.2倍増加した。尚、0%は、ジグリコシダーゼ単独の場合の結果である。

実施例 9 (ジグリコシダーゼ又は各市販酵素剤による大豆蛋白質の風味改善)

フジプロ(分離大豆蛋白質、不二製油株式会社製)10gに90mLの水を加え、十分に混和させて大豆蛋白質溶液を得た。これにジグリコシダーゼ又は各市販酵素剤(アミラーゼAD「アマノ」1、ADG-S-D S、リパーゼA「アマノ」6、ラクターゼF-D S、ラクターゼF、セルラーゼA「アマノ」3、ヘミセルラーゼ「アマノ」90G、プロテアーゼB、YL-15、ペクチナーゼPL「アマノ」、トランスグルコシダーゼL「アマノ」、グルクザイムNL4.2、全て天野エンザイム株式会社製)を添加し、大豆蛋白溶液中にジグリコシダーゼ(0.5AU)又は該各酵素剤がそれぞれ0.25%(w/v)となるようにした。50℃で5時間処理を行った。尚、反応pHは7.1であった。官能試験のため緩衝液による影響を考慮しpH調整は行わなかった(実施例10~12において同じ)。

官能試験（ジグリコシダーゼ又は各市販酵素剤により処理された分離大豆蛋白質の風味改善）

官能試験を行うため、ジグリコシダーゼ又は各市販酵素剤で処理された大豆蛋白質を 1500 x g、4℃で20分間遠心分離を行った。沈殿物を取り除き、塩酸を用いて上清のpHを6.0に調整した。この溶液を2倍希釈したものを用いて、試験を実施した。評価は熟練した5人のパネラーにより行われ、旨み、苦味・収斂味、後味を酵素未処理のコントロールと比較する事によって行った(表39)。

表39. 分離大豆蛋白質における酵素剤の風味改善効果

酵素名	パネラーA			パネラーB			パネラーC		
	旨み	苦味・ 収斂味	後味	旨み	苦味・ 収斂味	後味	旨み	苦味・ 収斂味	後味
未処理(コントロール)	±	±	±	±	±	±	±	±	±
ジグリコシダーゼ	±	--	+	±	-	+	±	--	±
アミラーゼAD「アマノ」1	±	--	+	±	--	±	±	-	±
ADG-S-DS	±	--	+	±	-	±	±	-	++
リパーゼA「アマノ」6	±	±	+	±	-	+	±	±	+
ラクターゼF-DS	±	±	±	±	±	-	±	±	±
ラクターゼF「アマノ」	±	±	±	±	±	±	±	±	±
セルラーゼA「アマノ」3	±	--	+	±	--	±	±	-	±
ヘミセルラーゼ「アマノ」90G	±	--	+	±	--	±	±	-	±
プロテアーゼB	±	+	±	±	±	±	±	±	±
YL-15	±	+++	+	±	+++	±	±	+++	±
ペクチナーゼPL	±	±	+	±	±	±	±	±	±
トランスグルコシダーゼL	±	±	±	±	±	±	±	±	±
グルクザイム	±	±	±	±	±	±	±	±	±

酵素名	パネラーD			パネラーE		
	旨み	苦味・ 収斂味	後味	旨み	苦味・ 収斂味	後味
未処理(コントロール)	±	±	±	±	±	±
ジグリコシダーゼ	+	±	+	+	-	±
アミラーゼAD「アマノ」1	±	±	±	±	-	±
ADG-S-DS	+	±	+	±	-	±
リパーゼA「アマノ」6	±	±	+	±	±	±
ラクターゼF-DS	±	±	-	±	±	±
ラクターゼF「アマノ」	±	±	±	±	±	±
セルラーゼA「アマノ」3	+	-	±	+	--	±
ヘミセルラーゼ「アマノ」90G	±	-	±	±	±	+
プロテアーゼB	±	±	±	±	±	±
YL-15	±	+++	±	±	+	±
ペクチナーゼPL	±	±	±	±	±	±
トランスグルコシダーゼL	±	±	±	±	±	±
グルクザイム	±	±	±	±	±	±

±: コントロールと変化無し。

+: "旨み"および"後味"については改善され、"苦味・収斂味"については強くなったことを意味する。

-: "旨み"および"後味"については悪化し、"苦味・収斂味"については低減されたことを意味する
+および-の数が多いほど、その傾向がより強い事を意味する。

その結果、ジグリコシダーゼ、アミラーゼAD「アマノ」1、ADG-S-D S、リパーゼA「アマノ」6、セルラーゼA「アマノ」3、ヘミセルラーゼ「アマノ」90Gによって苦味・収斂味が低減あるいは消失した。

また、後味の改善にはジグリコシダーゼ、アミラーゼAD「アマノ」1、ADG-S-D S、リパーゼA「アマノ」6、セルラーゼA「アマノ」3、ヘミセルラーゼ「アマノ」90G、YL-15、ヘクチナーゼPL「アマノ」による処理で効果がある事が示された。検討項目以外にも、これらの酵素剤によって甘みが出てくことや青臭さが低減される事など、全体的な風味が改善されることが示された。

実施例10（ジグリコシダーゼ及び各市販酵素剤による大豆蛋白質の風味改善）

フジプロ（分離大豆蛋白質、不二製油株式会社製）10gに90mLの水を加え、十分に混和させて大豆蛋白質溶液を得た。これにジグリコシダーゼ及び各市販酵素剤（アミラーゼAD「アマノ」1、ADG-S-D S、リパーゼA「アマノ」6、ラクターゼF-D S、ラクターゼF、セルラーゼA「アマノ」3、ヘミセルラーゼ「アマノ」90G、プロテアーゼB、YL-15、ヘクチナーゼPL「アマノ」、トランスグルコシダーゼL「アマノ」、グルクザイムNL4、2、全て天野エンザイム株式会社製）を添加し、大豆蛋白溶液中にジグリコシダーゼが6.5AU及び該各酵素剤がそれぞれ0.25%（w/v）となるようにした。50℃で5時間処理を行い、酵素処理された大豆蛋白質を得た。尚、反応pHは7.1であった。

官能試験（ジグリコシダーゼ及び各市販酵素剤により処理された分離大豆蛋白質の風味改善）

官能試験を行うため、酵素処理された大豆蛋白質を1500xg、4℃で20分間遠心分離を行った。沈殿物を取り除き、塩酸を用いて上清のpHを6.0に調整した。この溶液を2倍希釈したものをを用いて、試験を実施した。評価は熟練した5人のパネラーにより行われ、旨み、苦味・収斂味、後味を酵素未処理のコントロールと比較する事によって行った（表40）。

表40. 酵素の組み合わせによる分離大豆蛋白質の風味改善

酵素名	パネラーA			パネラーB			パネラーC		
	旨み	苦味・ 収斂味	後味	旨み	苦味・ 収斂味	後味	旨み	苦味・収 斂味	後味
未処理 (コントロール)	±	±	±	±	±	±	±	±	±
ジグリコシダーゼ + アミ ラーゼAD「アマノ」1	±	---	+	+	---	+	±	--	±
ジグリコシダーゼ + ADG -S-DS	+	---	±	+	-	±	++	--	++
ジグリコシダーゼ + リパ ーゼA「アマノ」6	+	---	±	±	-	±	+	±	+
ジグリコシダーゼ + ラク ターゼF-DS	±	-	±	±	-	±	+	±	±
ジグリコシダーゼ + ラク ターゼF「アマノ」	±	±	+	+	-	±	+	±	+
ジグリコシダーゼ + セル ラーゼA「アマノ」3	±	---	++	+	---	+	+	-	±
ジグリコシダーゼ + ヘミ セルラーゼ「アマノ」90G	±	---	++	+	--	±	+	-	±
ジグリコシダーゼ + プロ テアーゼB	±	---	±	+	-	±	±	--	±
ジグリコシダーゼ + YL-15	±	+	+	+	+	+	+	±	+
ジグリコシダーゼ + ベク チナーゼPL「アマノ」	±	-	++	+	-	±	+	--	±
ジグリコシダーゼ + トラ ンスグルコシダーゼL「アマ ノ」	±	-	±	±	-	±	±	-	±
ジグリコシダーゼ + グル クザイムNL4. 2	±	±	±	+	-	±	±	±	±

酵素名	パネラーD			パネラーE		
	旨み	苦味・ 収斂味	後味	旨み	苦味・ 収斂味	後味
未処理 (コントロール)	±	±	±	±	±	±
ジグリコシダーゼ + アミラーゼAD「アマノ」1	++	±	±	+	--	++
ジグリコシダーゼ + ADG-S-DS	++	-	++	±	--	+
ジグリコシダーゼ + リパーゼA「アマノ」6	++	±	+	±	-	+
ジグリコシダーゼ + ラクターゼF-DS	±	±	±	+	-	±
ジグリコシダーゼ + ラクターゼF「アマノ」	+	±	+	±	--	++
ジグリコシダーゼ + セルラーゼA「アマノ」3	++	-	±	+	---	+
ジグリコシダーゼ + ヘミセルラーゼ「アマノ」90G	++	-	++	+	-	±
ジグリコシダーゼ + プロテアーゼB	++	±	±	±	-	+
ジグリコシダーゼ + YL-15	+	++	+	±	±	+
ジグリコシダーゼ + ベクチナーゼPL「アマノ」	++	±	+	±	-	+
ジグリコシダーゼ + トランスグルコシダーゼL「アマノ」	+	±	±	+	-	±
ジグリコシダーゼ + グルクザイムNL4. 2	+	±	±	±	-	±

その結果、表に示したジグリコシダーゼと各市販酵素剤の全ての組み合わせ(ジグリコシダーゼとアミラーゼAD「アマノ」1、ジグリコシダーゼとADG-S-D S、ジグリコシダーゼとリパーゼA「アマノ」6、ジグリコシダーゼとラクターゼF-D S、ジグリコシダーゼとラクターゼF「アマノ」、ジグリコシダーゼとセルラーゼA「アマノ」3、ジグリコシダーゼとヘミセルラーゼ「アマノ」90 G、ジグリコシダーゼとプロテアーゼB、ジグリコシダーゼとYL-15、ジグリコシダーゼとペクチナーゼPL「アマノ」、ジグリコシダーゼとトランスグルコシダーゼL、ジグリコシダーゼとグルクザイム)において、旨みを感じられる、苦味・収斂味の低減、あるいは後味が改善されるといった効果がある事が示された。これらのことから、ジグリコシダーゼ単独よりも、ジグリコシダーゼと各市販酵素剤の組み合わせの方が、風味改善の効果がより高まる事が明らかとなった。

実施例11 (ジグリコシダーゼ又は各市販酵素剤による豆乳の風味改善)

成分無調製の豆乳(ギトー食品株式会社)20 mLに対し、ジグリコシダーゼ又は各市販酵素剤(ADG-S-D S、アミラーゼAD「アマノ」1、セルラーゼA「アマノ」3、ヘミセルラーゼ「アマノ」90 G、全て天野エンザイム株式会社製)を添加し、豆乳中にジグリコシダーゼが6.5 AU又は各酵素剤がそれぞれ0.25% (w/v)となるように添加した。55℃で1.5時間処理後、70℃で1時間の加熱処理により酵素を失活させた。尚、反応pHは6.6であった。

官能試験(ジグリコシダーゼ又は各市販酵素剤により処理された豆乳の風味改善)

この様にして得られた酵素処理液を水で3倍に希釈し、官能試験に供した。評価は熟練した5人のパネラーにより、甘味、苦味・収斂味、後味を酵素未処理のコントロールと比較する事によって行った(表41)

表41 豆乳における酵素剤の風味改善効果

酵素名	パネラーA			パネラーB			パネラーC		
	甘み	苦味・ 収斂味	後味	甘み	苦味・ 収斂味	後味	甘み	苦味・ 収斂味	後味
未処理（コントロール）	±	±	±	±	±	±	±	±	±
ジグリコシダーゼ	±	—	±	±	±	±	++	—	+
ADG-S-DS	+	—	±	+	—	+	±	—	±
アミラーゼAD「アマノ」1	+	—	+	+	—	+	+	—	±
セルラーゼA「アマノ」3	±	±	±	+	—	+	±	—	±
ヘミセルラーゼ「アマノ」90G	±	±	±	+	—	+	±	±	±

酵素名	パネラーD			パネラーE		
	甘み	苦味・ 収斂味	後味	甘み	苦味・ 収斂味	後味
未処理（コントロール）	±	±	±	±	±	±
ジグリコシダーゼ	+	±	±	+	±	±
ADG-S-DS	+	±	±	+	±	±
アミラーゼAD「アマノ」1	±	±	±	±	±	±
セルラーゼA「アマノ」3	±	±	±	+	—	+
ヘミセルラーゼ「アマノ」90G	±	±	±	+	—	+

ここに示したジグリコシダーゼ又は市販酵素剤によって、甘みが生じること、そして苦味・収斂味が低減される事及び後味が改善される事が示された。

実施例12（ジグリコシダーゼ及び各市販酵素剤による豆乳の風味改善）

成分無調製の豆乳（ギトー食品株式会社）20 mLに対し、ジグリコシダーゼと各市販酵素剤（ADG-S-DS、アミラーゼAD「アマノ」1、セルラーゼA「アマノ」3又はヘミセルラーゼ「アマノ」90G、全て天野エンザイム株式会社製）を添加し、豆乳中にジグリコシダーゼが6.5 AU及び該各市販酵素剤がそれぞれ0.25%（w/v）となるように添加した。55℃で1.5時間処理後、70℃で1時間の加熱処理により酵素を失活させた。尚、反応pHは6.6であった。

官能試験（ジグリコシダーゼ及び各市販酵素剤により処理された豆乳の風味改善）

この様にして得られた酵素処理液を水で3倍に希釈し、官能試験に供した。評価は熟練した5人のパネラーにより、甘味、苦味・収斂味、後味を酵素未処理のコントロールと比較する事によって行った（表42）

表42. 酵素の組み合わせによる豆乳の風味改善

酵素名	パネラーA			パネラーB			パネラーC		
	甘み	苦味・ 収斂味	後味	甘み	苦味・ 収斂味	後味	甘み	苦味・ 収斂味	後味
未処理 (コントロール)	±	±	±	±	±	±	±	±	±
ジグリコシダーゼ + ADG-S-DS	+	---	±	+	-	+	++	---	+
ジグリコシダーゼ + アミラーゼAD「アマノ」1	+	---	+	+	---	±	+	---	±
ジグリコシダーゼ + セルラーゼA「アマノ」3	±	-	±	+	-	++	++	---	+
ジグリコシダーゼ + ヘミセルラーゼ「アマノ」90G	+	-	±	+	-	+	+	-	±

酵素名	パネラーD			パネラーE		
	甘み	苦味・ 収斂味	後味	甘み	苦味・ 収斂味	後味
未処理 (コントロール)	±	±	±	±	±	±
ジグリコシダーゼ + ADG-S-DS	+	-	±	++	±	±
ジグリコシダーゼ + アミラーゼAD「アマノ」1	+	-	+	+	±	±
ジグリコシダーゼ + セルラーゼA「アマノ」3	+	-	+	++	-	+
ジグリコシダーゼ + ヘミセルラーゼ「アマノ」90G	+	±	±	++	-	+

官能評価の結果、表に示したジグリコシダーゼと市販酵素剤の全ての組み合わせ（ジグリコシダーゼとADG-S-DS、ジグリコシダーゼとアミラーゼAD「アマノ」1、ジグリコシダーゼとセルラーゼA「アマノ」3、ジグリコシダーゼとヘミセルラーゼ「アマノ」90G）で、甘みが感じられる、苦味・収斂味の低減、あるいは後味が改善されるといった効果がある事が示された。さらに、このような酵素処理によって、大豆蛋白質に特有の青臭さも低減される等、全体的に風味が改善されることが明らかとなった。これらのことからジグリコシダーゼ単独あるいは、市販酵素剤単独よりもジグリコシダーゼと市販酵素剤の組み合わせの方が、風味改善の効果が高くなる事が明らかとなった。

実施例13（ジグリコシダーゼによる胃内pHでの脱脂大豆タンパクからのアグリコンイソフラボンの生成）

脱脂大豆タンパク（不二製油株式会社製）0.05gをpH4.0の20mM酢酸緩衝液に懸濁した。懸濁液のpHを測定し、1N塩酸溶液でpHを4.0に調整しつ

つ液量を4.5 mLに調整した。粗ジグリコシダーゼのジグリコシダーゼ活性を1.88 AU/mLに調整した酵素液を0.5 mL添加し、最終液量を5.0 mL（脱脂大豆タンパクの濃度：1%（w/v））とし、37°Cで3時間処理した。処理後反応物25 μ lにメタノール75 μ lと水500 μ lを加え0.2 μ mのフィルターで濾過後水で更に2.5倍希釈後、HPLC分析した。

上記のように、脱脂大豆蛋白を食事中的胃内pHの範囲であるpH4で処理した結果、酵素を加えないpH4の処理ではアグリコンイソフラボンの遊離は見られなかったが、ジグリコシダーゼで処理したものにはアグリコンイソフラボンの遊離が認められた。従って、胃内pHの条件でジグリコシダーゼはイソフラボン配糖体をアグリコンイソフラボンに変換できることがわかった

実施例14（ジグリコシダーゼによる胃内pHでのきな粉からのアグリコンイソフラボンの生成）

2.5 gのきな粉（角大産業社製）を100 mLの50 mM酢酸緩衝液（pH 5）に懸濁させた。

この3 mLにジグリコシダーゼ（290 AU/g）0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.15, 0.374, 0.75, 1.5 mgを添加し、37°Cにて30分間振盪しながら、インキュベートした。反応後、10 mLのメタノールを添加し、アグリコンイソフラボンを抽出し、HPLCにて分析した。

上記のように、胃内環境を想定し、pH5で37°Cにて30分間反応させたときのきな粉に含まれるイソフラボン配糖体からのアグリコンイソフラボンの生成を調べた結果、表4.3及び図3に示すようにイソフラボン配糖体の80%以上をイソフラボンアグリコンに変換することができた。この結果は、ジグリコシダーゼを経口投与したとき、胃内でイソフラボン配糖体からアグリコンイソフラボンが生成することを示唆するものである。

表 4 3 ジグリコシダーゼ添加量とアグリコンイソフラボン生成 (%) の
関係

ジグリコシダーゼ	アグリコンイソフラボン (%)
1.500	86.1%
0.750	81.3%
0.374	74.7%
0.150	65.4%
0.075	56.3%
0.050	51.1%
0.025	44.3%
0.010	31.0%
0.005	20.3%
0.002	12.8%
0.001	9.2%
0	5.0%

実施例 1 5 (ジグリコシダーゼによる胃内 pH でのイソフラボン製剤からのアグリコンイソフラボンの生成)

150 mg のイソフラボン製剤 (Nature's Bounty 社製, 米国) を 100 mL の 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5) に懸濁させた。この 3 mL にジグリコシダーゼ (290 AU/g) 0、0.00045、0.00113、0.00225、0.0045、0.009、0.0225、0.045、0.09、0.18、0.45、0.9 mg を添加し、37℃にて30分間振盪しながら、インキュベートした。反応後、10 mL のメタノールを添加し、アグリコンイソフラボンを抽出し、HPLCにて分析した。

上記のように、胃内環境を想定し、pH 5 で 37℃にて30分間反応させたときのイソフラボン製剤に含まれるイソフラボン配糖体からのアグリコンイソフラボンの生成を調べた結果、表 4 4 及び図 4 に示すようにイソフラボン配糖体の約 80% をイソフラボンアグリコンに変換することができた。この結果は、ジグリコシダーゼを経口投与したとき、胃内でイソフラボン配糖体からアグリコンイソフラボンが生成することを示唆するものである

表 4 4 ジグリコシダーゼ添加量とアグリコンイソフラボン生成 (%) の関係

ジグリコシダーゼ (mg)	アグリコンイソフラボン (%)
0.90000	79.4%
0.45000	78.7%
0.18000	75.3%
0.09000	70.7%
0.04500	64.6%
0.02250	59.2%
0.00900	47.5%
0.00450	38.9%
0.00225	30.3%
0.00113	25.6%
0.00045	21.5%
0.00000	20.0%

産業上の利用可能性

酸・アルカリ処理や醗酵工程によらず、素材の物理的性質を実質的に変えることなく、且つ効率よくアグリコン型の生理活性物質を製造できる。

ジグリコシダーゼは、既存のグルコシダーゼでは難分解性の 6' , 6' -O-アセチル及び 6' , 6' -O-マロニルグルコシドに良く作用する性質があることから、公開公報 (特開平 10-117792) に記載の難分解性イソフラボン配糖体をアルカリ処理によりグルコシダーゼ分解性のイソフラボン配糖体に変換する工程を行う必要がなく、一段階でプロセスを行うことができる。また本方法では、強酸を用いた加水分解による方法で引き起こされる、蛋白質やリン脂質などの分解に起因する原料の物性変化をほとんど引き起こさない。また、ジグリコシダーゼ及び／又は特定の酵素剤を使用することにより蛋白質又は蛋白質含有食品のアグリコン量を高め、またその風味を改善することもできる。

請求の範囲

1. ジグリコシダーゼを、ファイトエストロゲン、ポリフェノール、イソフラボン、ビオカニンA、ホルムオノネチン、クメストロール及びリグナンからなる群から選択される化合物をアグリコンとする配糖体へ作用させてアグリコンを生成させることを特徴とするアグリコンの製造方法。

2. アグリコンがイソフラボンである請求項1のアグリコンの製造方法。

3. イソフラボンをアグリコンとする配糖体がダイズイン、ゲニスチン又はグリシチン、これらのアセチル体、サクシニル体又はマロニル体からなる群から選択される1種以上である請求項1又は2記載のアグリコンの製造方法。

4. ジグリコシダーゼがグルコース耐性を有するものである請求項1～3の何れかに記載のアグリコンの製造方法。

5. ジグリコシダーゼがペニシリウム マルタイカラー (*Penicillium multicolor*) IAM7153が産生するジグリコシダーゼである請求項1～4の何れかに記載のアグリコンの製造方法。

6. 蛋白質又は蛋白質含有食品にジグリコシダーゼを作用させる工程を含むことを特徴とするアグリコン含量を高めた蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法。

7. 蛋白質又は蛋白質含有食品がイソフラボンをアグリコンとする配糖体を含む請求項6記載のアグリコン含量を高めた蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法。

8. 製造される蛋白質又は蛋白質含有食品が更に風味が改善されたものである請求項6又は7記載のアグリコン含量を高めた蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法。

9. イソフラボンをアグリコンとする配糖体がダイズイン、ゲニスチン又はグリシチン、これらのアセチル体、サクシニル体又はマロニル体からなる群から選択される1種以上である請求項6～8の何れかに記載のアグリコン含量を高めた蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法。

10. 更にアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、 α -グルコシダーゼ及び酵

母溶解性酵素からなる群より選ばれた少なくとも 1 種の酵素を主体として含む酵素剤を作用させる工程を含むことを特徴とする請求項 6～9 の何れかに記載のアグリコン含量を高めた蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法。

11. 風味の改善が、苦味及び／又は収斂味の低減である請求項 6～10 の何れかに記載のアグリコン含量を高めた蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法。

12. 蛋白質又は蛋白質含有食品に、アミラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、 α -グルコシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ及び酵母溶解性酵素からなる群より選ばれた少なくとも 1 種の酵素を主体として含む酵素剤を作用させる工程を含むことを特徴とする風味が改善された蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法。

13. 蛋白質又は蛋白質含有食品がフラボノイドをアグリコンとする配糖体を含有する請求項 12 記載の風味が改善された蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法。

14. 蛋白質又は蛋白質含有食品がイソフラボンをアグリコンとする配糖体を含有する請求項 12 または 13 記載の風味が改善された蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法。

15. ジグリコシダーゼを経口投与し、生体内で配糖体からアグリコンを生成させる方法。

16. ジグリコシダーゼを経口投与し、生体内でイソフラボンをアグリコンとする配糖体からイソフラボンを生成させる請求項 15 に記載の方法。

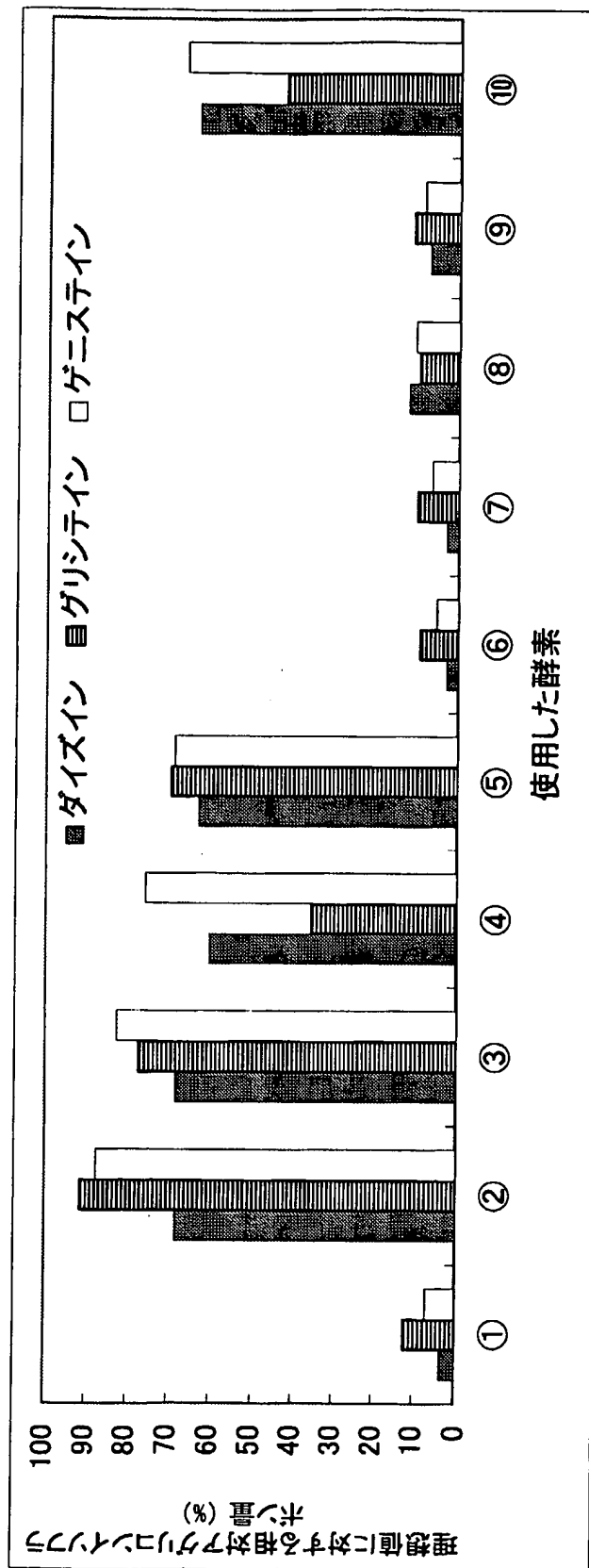
17. ジグリコシダーゼを配糖体型の生理活性物質へ作用せしめることを特徴とする、配糖体型の生理活性物質をアグリコン型の生理活性物質へ変換する方法。

18. 配糖体型の植物性生理活性物質を含有する植物材料にジグリコシダーゼを作用せしめることを特徴とする、アグリコン型の植物性生理活性物質に富んだ組成物の製造方法。

19. 配糖体型の生理活性物質を含有する食物の摂取前、摂取中、及び／又は摂取後に、ジグリコシダーゼを経口投与することを特徴とする生理活性物質の生体吸収の促進方法。

20. 少なくともジグリコシダーゼを含有することを特徴とする、配糖体型の生理活性物質のアグリコン型の生理活性物質への変換剤。

図1



- ①: 酵素無添加
- ②: ジグリコシダーゼ+アミラーゼAD「アマノ」¹
- ③: ジグリコシダーゼ+YL-15
- ④: ジグリコシダーゼ+グルカサイルNL-4.2
- ⑤: ジグリコシダーゼ+
- ⑥: アミラーゼAD「アマノ」¹
- ⑦: YL-15
- ⑧: グルカサイルNL-4.2
- ⑨: トランスグルコシダーゼ「アマノ」
- ⑩: ジグリコシダーゼ

図2

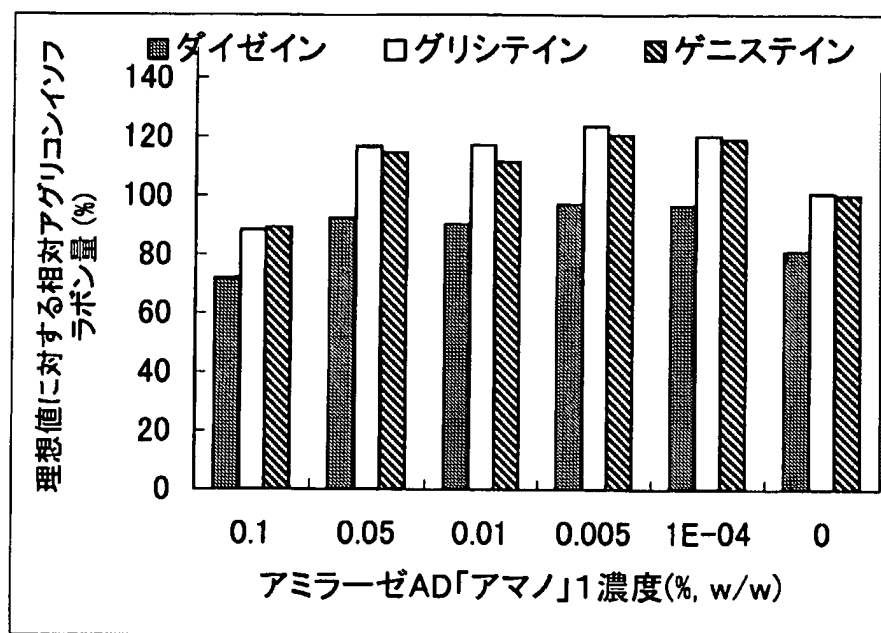


図 3

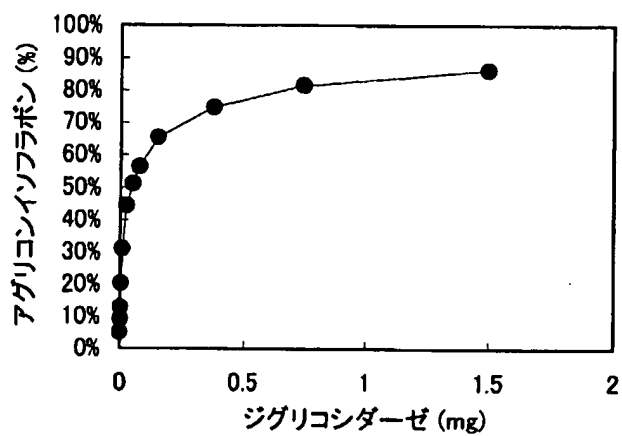
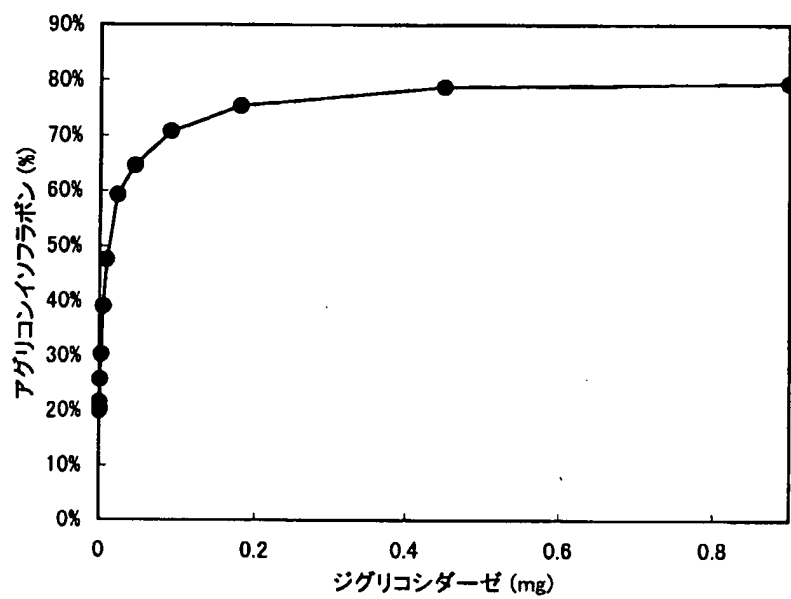


図 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02656

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12P 17/06, A23L 1/30 // C12N 9/24, (C12P 17/06, C12R 1:80)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12P 17/06, A23L 1/30

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO, 00/18931, A1 (Amano Pharmaceutical Co., Ltd.), 06 April, 2000 (06.04.00), & AU, 9959988, A	1-20
X A	JP, 11-89589, A (Fuji Oil Company, Limited), 06 April, 1999 (06.04.99) (Family: none)	1-4, 6-20 5
X A	US, 5827682, A (Protein Technologies Int. Inc.), 27 October, 1998 (27.10.98), & JP, 10-117792, A & EP, 837139, A2	1-4, 6-20 5
X A	US, 5726034, A (Protein Technologies Int. Inc.), 10 March, 1998 (10.03.98), & JP, 10-99089, A & EP, 827698, A2	1-4, 6-20 5
X A	WO, 95/10512, A1 (Protein Technologies Int. Inc.), 20 April, 1995 (20.04.95), & EP, 723536, A1 & US, 5637561, A	1-4, 6-20 5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
19 June, 2001 (19.06.01)

Date of mailing of the international search report
03 July, 2001 (03.07.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02656

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO, 95/10530, A1 (Protein Technologies Int. Inc.), 20 April, 1995 (20.04.95), & EP, 804462, A1 & US, 5763389, A & US, 6015785, A	1-4,6-20 5
X A	US, 5789581, A (Kikkoman Corporation), 04 August, 1998 (04.08.98) & JP, 8-283283, A	1-4,6-20 5
X A	JP, 8-214787, A (Nichimo Co., Ltd.), 27 August, 1996 (27.08.96) (Family: none)	1-4,6-20 5
X A	JP, 8-140675, A (Mitsui Norin K.K.), 04 June, 1996 (04.06.96) (Family: none)	1-4,6-20 5
X A	Masaru MATSUURA et al., " β -Glucosidases from Soybeans Hydrolyze Daidzin and Genistin", J. Food. Sci., (1993), Vol.58, No.1, pages 144 to 147	1-4,6-20 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02656

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)


This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as set forth in claims 1 to 11 and 15 to 20 pertain to a process for producing an aglycon by using an enzyme having an activity of releasing saccharides in disaccharide unit from a disaccharide glycoside, a process for producing a protein or a protein-containing food containing an aglycon in an elevated amount, a process for forming an aglycon, a process for converting into a physiologically active substance of the aglycon type, a converting agent therefor and a process for producing a composition rich in a physiologically active substance of the aglycon type. On the other hand, the inventions as set forth in claims 12 to 14 may involve enzymes other than the above-described enzyme. Such being the case, these two groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ¹ C12P 17/06, A23L 1/30//C12N 9/24, (C12P 17/06, C12R 1:80)		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ¹ C12P 17/06, A23L 1/30		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 00/18931, A1 (天野製菓株式会社) 6. 4月. 2000 (06. 04. 00) & AU, 9959988, A	1-20
X A	JP, 11-89589, A (不二製油株式会社) 6. 4月. 1999 (06. 04. 99) (ファミリーなし)	1-4, 6-20 5
X A	US, 5827682, A (Protein Technologies Int. Inc.) 27. 10月. 1998 (27. 10. 98) & JP, 10-117792, A & EP, 837139, A2	1-4, 6-20 5
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	19. 06. 01	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 本間 夏子 
		4N 2937
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	US, 5726034, A (Protein Technologies Int. Inc.) 10. 3月. 1998 (10. 03. 98) & JP, 10-99089, A & EP, 827698, A2	<u>1-4, 6-20</u> 5
<u>X</u> A	WO, 95/10512, A1 (Protein Technologies Int. Inc.) 20. 4月. 1995 (20. 04. 95) & EP, 723536, A1 & US, 5637561, A	<u>1-4, 6-20</u> 5
<u>X</u> A	WO, 95/10530, A1 (Protein Technologies Int. Inc.) 20. 4月. 1995 (20. 04. 95) & EP, 804462, A1 & US, 5763389, A & US, 6015785, A	<u>1-4, 6-20</u> 5
<u>X</u> A	US, 5789581, A (Kikkoman Corp.) 4. 8月. 1998 (04. 08. 98) & JP, 8-283283, A	<u>1-4, 6-20</u> 5
<u>X</u> A	JP, 8-214787, A (ニチモウ株式会社) 27. 8月. 1996 (27. 08. 96) (ファミリーなし)	<u>1-4, 6-20</u> 5
<u>X</u> A	JP, 8-140675, A (三井農林株式会社) 4. 6月. 1996 (04. 06. 96) (ファミリーなし)	<u>1-4, 6-20</u> 5
<u>X</u> A	MASARU MATSUURA et al. "β-Glucosidases from Soybeans Hydrolyze Daidzin and Genistin.", J. Food. Sci. (1993) Vol. 58, No. 1, p. 144-147	<u>1-4, 6-20</u> 5

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-11, 15-20は、二糖配糖体から二糖単位で糖を遊離する活性を有する酵素を用いたアグリコンの製造方法、アグリコンの含量を高めた蛋白質又は該蛋白質含有食品の製造方法、アグリコンを生成させる方法、アグリコン型の生理活性物質へ変換する方法及び変換剤、アグリコン型の植物性生理活性物質に富んだ組成物の製造方法に関するものであり、請求の範囲12-14は、上記酵素とは違う酵素をも含み得ることから、これら2つの発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。